



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico-Biológicas**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Identificación de Compuestos Bioactivos  
en Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L)  
Bioprocesado. Propiedades Antioxidante e  
Hipoglucemiante**

**T E S I S**

Que presenta

**LN. Malenny Rivas Medina**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA  
Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores

**Dra. Liliana León López**

**Dr. Roberto Gutiérrez Dorado**

**Culiacán de Rosales, Sinaloa, México**

**Febrero de 2018**

Este trabajo titulado “**Identificación de Compuestos Bioactivos en Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) Bioprocesado. Propiedades Antioxidante e Hipoglucemiante**” se desarrolló en el Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales del Posgrado en Ciencia y Tecnología de alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los Doctores Liliana León López y Roberto Gutiérrez Dorado participaron como Directores de Tesis y los Doctores Cuauhtémoc Reyes Moreno, Janitzio Xiomara K. Perales Sánchez, Edith O. Cuevas Rodríguez y Nancy Yareli Salazar Salas participaron como asesores. La tesista Malenny Rivas Medina recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 08 del mes febrero del año 2018, el (la) que suscribe LN. Malenny Rivas Medina alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0922840-3, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Liliana León López y Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación de Compuestos Bioactivos en Frijol Común (*phaseolus vulgaris* L) Bioprocesado. Propiedades Antioxidante e Hipoglucemiante", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Malenny Rivas

Malenny Rivas Medina

---

Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa** por permitirme culminar mis estudios de licenciatura y posgrado en sus instalaciones.

A la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas** y a los doctores y maestros pertenecientes al **posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos** por aceptarme como alumna y contribuir en mi formación académica y la finalización de mis estudios de posgrado

A mi **familia** que es el pilar más grande en mi vida, gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y del trabajo y que no hay imposibles para lo que nos proponemos. A mi **nana Chepa** y mi **tata Manuel** por su amor incondicional, sé que estarían muy orgullosos de mí. A mis bebés **Kucho** y **Pancho** (que en paz descansa) por todas las noches que me hicieron compañía, y la alegría que me dan.

A mis directores de tesis, **Dr. Roberto** muchas gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por ser un director accesible siempre dispuesto a ayudar, gracias por la dirección de este trabajo y sobre todo por su paciencia. **Dra. Liliana** muchas gracias por todos los conocimientos que me transmitió, por sus palabras de ánimo, por su apoyo constante, gracias por su esmero y dedicación en este trabajo, gracias por su amistad.

A la **Dra. Yarely** y la **Dra. Gaby** que con su ayuda fue posible una parte muy importante de este trabajo, muchas gracias por su tiempo y atención. A **Fernanda**

**Quintero** gracias por todas tus enseñanzas, gracias por tu tiempo y dedicación, gracias por siempre estar dispuesta a ayudar y por todas tus palabras de ánimo, este trabajo sería más difícil sin personas como tú.

A mis compañeros y amigos de generación **Marco, Carolina, Glenda, Perla, Denisse, Alexis, Briseyda** por todos los momentos compartidos en el aula y fuera de ella, gracias por sus palabras de apoyo en los pasillos.

A mis compañeros de laboratorio **Dra. Xiomara, Dra. Eva, Mario, Daniel, Denisse, Celeste, Jenny, Brenda** gracias por su contribución en este trabajo, gracias por siempre explicarnos las cosas más de una vez, gracias por hacer más llevaderos los días en el laboratorio y por todas las experiencias. Al **Dr. Luis** por su paciencia en enseñarme a hacer tempe y por siempre atender a nuestras dudas. A las niñas y niños de servicio **Librado, Alejandra, Katie y Miriam** gracias por toda su ayuda, principalmente a descascarillar frijol aunque lo odiaran siempre me apoyaban. A mis compañeros nuevos de laboratorio **Luisa, Yazmín, Martín y Demis** gracias por sus palabras de ánimo.

A mi mafren **Fernando Salas** le dedico un párrafo para él solito por que el 90% de las técnicas de laboratorio que hoy sé son gracias a él, su extremada obsesión por el orden y la limpieza hacían del laboratorio un lugar mejor, porque por sus regaños aprendí a trabajar de la manera correcta, porque cuando estaba al punto del abismo siempre estaba dispuesto a ayudarme hasta con un delicioso café, gracias mafren por la gran persona que eres pero sobre todo por tu amistad, te quiero mucho.

A mis amigas **Vanessa, Eunice, Gracia, Gladys, Deneb** por siempre darme ánimos, por aguantar mis momentos de estrés y mis pláticas sobre la tesis, las adoro.

Y por último pero no menos importante a mis mafrens **Blanca, Fernanda y Melissa** que contribuyeron de todas las maneras posibles a la realización de este proyecto, no tengo palabras para agradecer todas las risas, el llanto, y los momentos que hemos pasado juntas. Muchas gracias por su apoyo incondicional y su amistad, las quiero.

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	8
A. ESTRÉS OXIDATIVO.....	8
1. <b>Especies reactivas de oxígeno (ROS)</b> .....	8
2. <b>Compuestos antioxidantes</b> .....	12
B. ENFERMEDADES CRONICO DEGENERATIVAS.....	14
1. <b>Diabetes mellitus</b> .....	14
C. ALIMENTOS FUNCIONALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS.....	21
1. <b>Alimentos funcionales</b> .....	21
2. <b>Compuestos bioactivos en alimentos</b> .....	21
D. FRIJOL ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	25
1. <b>Estructura del grano</b> .....	26
2. <b>Producción</b> .....	28
3. <b>Composición química</b> .....	28

<b>4. Propiedades nutraceuticas.....</b>	38
E. FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (FES).....	40
<b>1. Tempe.....</b>	40
<b>2. Efecto de la FES sobre la composición química de leguminosas</b> .....	48
<b>3. Efecto de la FES sobre e valor nutricional de leguminosas.....</b>	52
<b>4. Efecto de la FES sobre el contenido de fitoquímicos en leguminosas</b> .....	54
<b>5. Efecto de la FES sobre las propiedades nutraceuticas de</b> <b>leguminosas.....</b>	56
IV. JUSTIFICACIÓN.....	59
V. OBJETIVOS.....	60
A. OBJETIVO GENERAL.....	60
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	60
VI. MATERIALES Y METODOS.....	61
A. MATERIALES.....	61
B. METODOS.....	61
<b>1. Características físicas del grano de frijol común (<i>P. vulgaris</i>).....</b>	61
<b>2. Obtención de las harinas de frijol común.....</b>	62
<b>3. Obtención de los extractos de fitoquímicos libres.....</b>	65

4. <b>Determinación de compuestos fenólicos totales.....</b>	66
5. <b>Identificación de compuestos fenólicos.....</b>	66
6. <b>Evaluación de Actividad Antioxidante.....</b>	68
7. <b>Actividad hipoglucemiante.....</b>	70
8. <b>Análisis estadístico.....</b>	72
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	73
A. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL GRANO DE FRIJOL COMÚN ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	73
B. EFECTO DEL PROCESO DE <i>FES</i> SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS HIDRÓFILICOS TOTALES DE FRIJOL COMÚN.....	75
1. <b>Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la <i>FES</i> sobre el             contenido de fenólicos hidrofílicos totales de harinas de frijol             común.....</b>	75
2. <b>Efecto de la <i>FES</i> sobre el contenido de fenólicos hidrofílicos totales             de harinas de frijol común.....</b>	78
C. EFECTO DEL PROCESO DE <i>FES</i> SOBRE EL PERFIL Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS HIDROFÍLICOS INDIVIDUALES IDENTIFICADOS EN FRIJOL COMÚN.....	81
1. <b>Identificación de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales en             frijol común variedades azufrado higuera y negro Jamapa.....</b>	81

<b>2. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre el contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales de harinas de frijol común.....</b>	<b>94</b>
<b>D. EFECTO DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE FES SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FITOQUÍMICOS HIDRÓFILICOS DE FRIJOL COMÚN.....</b>	<b>114</b>
<b>1. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común.....</b>	<b>114</b>
<b>2. Efecto de la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común.....</b>	<b>120</b>
<b>E. EFECTO DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE FES SOBRE LA POTENCIAL HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE FRIJOL COMÚN.....</b>	<b>124</b>
<b>1. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común.....</b>	<b>124</b>
<b>2. Efecto de la FES sobre la actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de frijol común.....</b>	<b>126</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>131</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>159</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Compuestos bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal	22
2	Estructura del grano de frijol común	27
3	Producción Mundial de Frijol. FAOSTAT	28
4	Estructura flavonoides en <i>P. vulgaris</i> L. Parte superior antocianinas, parte inferior glucósidos de flavonol.	37
5	Diagrama de flujo de para la fermentación en estado sólido de frijol común.	45
6	Diagrama de flujo para la obtención de harinas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Azufrado higuera y negro Jamapa).	62
7	Proceso de limpieza de extractos libres de frijol común	66
8	Separación de compuestos fenólicos en frijol común azufrado higuera por LC-DAD- MS	82
9	Separación de compuestos fenólicos en frijol común negro jamapa por LC-DAD- MS	83
10	Espectro de masas de los compuestos a) ácido ferúlico conjugado con ácido aldárico, b) Kaempferol-3-O-glucósido y c) Quercetina-3-O-glucósido.	88
11	Espectro UV de ácido ferúlico. (a) Muestra y (b) Estándar comercial	100

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Especies reactivas de oxígeno de interés biológico	9
2	Clasificación de antioxidantes endógenos y exógenos	13
3	Esqueletos estructurales básicos de compuestos fenólicos y polifenólicos	24
4	Principales estados productores de frijol en México.	30
5	Composición química de frijol común	31
6	Compuestos fenólicos presentes en frijol común	36
7	Microorganismos / condiciones para la fermentación en estado sólido	54
8	Efecto de la fermentación en estado sólido sobre la composición química y valor nutrimental de leguminosas	82
9	Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los niveles de fitoquímicos en leguminosas	83
10	Características físicas de los granos de frijol común	73
11	Contenido de fenólicos totales (CFT) en harinas de frijol común sin procesar y remojado cocido	75
12	Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por FES	78
13	Identificación de compuestos fenólicos en extractos libres de frijol común	81
14	Compuestos fenólicos ( $\mu\text{g/g}$ bs) en las diferentes fracciones de frijol común azufrado higuera.	91
15	Compuestos fenólicos individuales y en las diferentes fracciones de frijol común negro jamapa.	102
16	Actividad antioxidante de extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido	110
17	Actividad antioxidante de extractos fenólicos de harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por FES	115
18	Actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido	119
19	Actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de	121

harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y  
bioprocesado por FES

## I. RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más consumida en el mundo y es considerado un alimento funcional debido a su alto contenido de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos. A este grupo de compuestos se le han atribuido beneficios potenciales para la salud debido a su efecto positivo en la prevención de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes y en el tratamiento del estrés oxidativo; esto dado a su gran actividad antioxidante y capacidad para inhibir enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos y absorción de glucosa en sangre. Con el fin de mejorar y aumentar las propiedades nutricionales y nutracéuticas de esta leguminosa se han empleado diferentes bioprocesos como la fermentación en estado sólido (FES), la cual aumenta el contenido y la disponibilidad de nutrimentos y compuestos fenólicos bioactivos presentes en el frijol. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de las diferentes etapas del bioproceso de FES sobre los perfiles y niveles de compuestos fenólicos, y las propiedades antioxidante e hipoglucemiante de frijol común (variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa). Se empleó *Rhizopus oligosporus* ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) para la FES del frijol. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por UPLC-ESI-MS. El contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y potencial inhibitorio de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa se determinó mediante métodos colorimétricos. Se identificaron 14 compuestos fenólicos que se pueden agrupar en: derivados de ácidos hidroxicinámicos (derivados aldáricos de ácido ferúlico y ácido p-cumárico),

flavanoles (catequina, procianidinas), flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina y sus formas glucosiladas) e isoflavonas (Genisteína glucosilada). En general, los niveles de compuestos fenólicos totales y fenólicos individuales (ácidos hidroxicinámicos y genisteína glucosilada), así como el potencial inhibitorio de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa disminuyó por efecto del remojo-cocción en ambas variedades de frijol. Después del bioprocesamiento por FES, el contenido de compuestos fenólicos totales fue mayor al de los granos no procesados. Sin embargo, el cambio más significativo en los compuestos fenólicos durante la FES fue el aumento de kaempferol y miricetina en Azufrado Higuera y Negro Jamapa, respectivamente. De manera interesante, el contenido de Genisteína glucosilada se presentó solamente en la variedad de color negro. También la actividad antioxidante del frijol común aumentó 372% (ABTS), 127% (DPPH) y 159% (ORAC) en la variedad Azufrado Higuera, y 435% (ABTS), 30% (DPPH), 304% (ORAC) en la variedad Negro Jamapa después de la FES. Además, se observó un incremento en el potencial hipoglucemiante, expresado como aumento de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, en ambas variedades de frijol común por efecto de la FES. Esta investigación demostró que la FES es un bioproceso eficiente para la mejora del perfil y niveles de compuestos fenólicos asociados con el aumento del potencial antioxidante e hipoglucemiante de frijol común.

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most consumed legume worldwide and has been considered as a functional food due to its high content of bioactive compounds, such as phenolic compounds. The potential health benefits has been associated to this group of compounds due to its positive effect in prevention of chronic degenerative diseases including diabetes and for treatment of oxidative stress because of its high antioxidant activity and ability to inhibit enzymes related to carbohydrate digestion and blood glucose absorption. In order to improve and increase nutritional and nutraceutical properties of this legume different bioprocesses have been used, such as solid state fermentation (SSF), which increases the content and availability of nutrients and bioactive phenolic compounds present in beans. In the present work, the effect of the different stages of SSF on the profiles and levels of phenolic compounds, the antioxidant and hypoglycemic properties of common bean (varieties Azufrado Higuera and Negro Jamapa) were evaluated. *Rhizopus oligosporus* ( $1 \times 10^6$  spores / mL) was used for bean SSF. The identification and quantification of phenolic compounds was performed by UHPLC-MS. Also, the content of total phenolic compounds, antioxidant activity, inhibitory potential of the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes, were determined by colorimetric methods. In this study, 14 phenolic compounds were identified which can be grouped into: derivatives of hydroxycinnamic acids (aldaric derivatives of ferulic acid and *p*-coumaric acid), flavanols (catechin, procyanidins) and flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin and their glycosylated forms) and isoflavones (glycosylated genistein). In general, levels of total and individual phenolic compounds

(hydroxycinnamic acids and glycosylated genistein), as well as, potential inhibition of the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes decreased by the effect of soaking-cooking in both bean varieties. After SSF, total phenolic content in both bean varieties were higher in comparison to the unprocessed beans. However, the most significant change in phenolic compounds during SSF was the increase of kaempferol and myricetin for Azufrado Higuera and Negro Jamapa, respectively. As an interesting result, glycosylated genistein was increased by the effect of SSF only in Negro Jamapa variety. Also, antioxidant activity of common beans increased 372% (ABTS), 127% (DPPH) and 159% (ORAC) for Azufrado Higuera variety, and 435% (ABTS), 30% (DPPH), 304% (ORAC) for the Negro Jamapa variety after the SSF. In addition, an increase in hypoglycemic potential was observed, expressed as an increase in the inhibition of the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes in both common bean varieties as a result of SSF. This research demonstrated that SSF is an efficient bioprocess for the improvement of the profile and levels of phenolic compounds associated with the increase of antioxidant and hypoglycemic potential of common bean.

## II. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es una condición donde existe un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las antioxidantes del organismo, con balance favorable en las primeras. Este desbalance oxidativo está relacionado con el daño a macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) lo que conlleva a la aparición y progresión de enfermedades crónicas (Ames y col 1993). La diabetes mellitus es un desorden metabólico que surge por una falla del organismo en producir suficiente insulina y/o el desarrollo de resistencia a la insulina, resultando con altos niveles de glucosa en sangre, el mantenimiento de la misma provoca complicaciones macro y micro vasculares (Varghese y col 2013). Es por esto que, el tratamiento de diabetes tiene como objetivo la disminución de hiperglucemia (Barshes y col 2013). Uno de los tratamientos de diabetes son fármacos cuyo mecanismo de acción es inhibir enzimas encargadas de la hidrólisis del almidón ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa), y con esto disminuir la hiperglucemia postprandial, sin embargo, estos producen complicaciones gastrointestinales como flatulencia, dolor abdominal, entre otros (Nijpels y col 2008). En los últimos años, han incrementado las investigaciones en identificar potentes inhibidores enzimáticos de origen natural con menos efectos secundarios que los fármacos comerciales (Habtemariam 2011). En la literatura, se ha reportado que las leguminosas contienen compuestos bioactivos, que además de presentar potencial antioxidante, son capaces de inhibir a las enzimas que hidrolizan el almidón (El Sohaimy 2012). El frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L) es la leguminosa más consumida en el mundo, es reconocida por ser la principal fuente de proteínas en países de América Latina. Además de su aporte en proteína el frijol es fuente de

carbohidratos complejos, fibra, vitaminas y minerales (Wani y col 2010). Recientemente se le considera como alimento funcional por su contenido en compuestos bioactivos, principalmente fenólicos, a los que se le atribuye potencial benéfico en la salud, debido a su efecto positivo en la prevención de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes y el tratamiento del estrés oxidativo, dada su gran actividad antioxidante y capacidad para inhibir enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos, como el almidón, y absorción de glucosa en sangre (Maldonado y col 2015). Existe el interés en la búsqueda de procesamientos que mejoren las características nutraceuticas de alimentos funcionales como el frijol. La FES es un bioproceso que consiste en el crecimiento de microorganismos especialmente hongos en un sustrato solido con la presencia de pequeñas cantidades de agua, con la finalidad de mejorar características nutricionales, nutraceuticas y de sabor (Mitchell y col 2002). Se ha reportado que la aplicación de FES en leguminosas como el frijol mejora el contenido y biodisponibilidad de nutrimentos, así como, incrementa su potencial nutraceutico, como consecuencia del aumento en compuestos fenólicos (Reyes-Bastidas y col 2010). Sin embargo, no existen reportes acerca del efecto de la fermentación en estado sólido con el hongo *Rhizopus oligosporus* sobre los perfiles y niveles de compuestos fenólicos con actividad antioxidante e hipoglucemiante en frijol común. Es por ello que, este estudio es necesario para definir el posible beneficio antioxidante y el potencial hipoglucemiante de esta leguminosa fermentada. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de las diferentes etapas del bioproceso de FES sobre los perfiles y niveles de compuestos fenólicos, y las propiedades antioxidante e

hipoglucemiante de frijol común variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa, empleando el hongo *R. oligosporus*.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

#### A. ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida; sin embargo por reacciones químicas, acción de enzimas o por efecto de radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes llamadas radicales libres los cuales participan en un amplio número subsecuente de reacciones que permiten la formación de metabolitos reactivos con una alta capacidad oxidativa (Elejalde Guerra 2001). En los organismos vivos los niveles de radicales libres y otros metabolitos reactivos son controlados por defensas antioxidantes, que minimizan el daño oxidativo a las biomoléculas. El estrés oxidativo aparece cuando hay un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, esta alteración permite modificaciones perjudiciales en las biomoléculas dando lugar a enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Rodríguez-Perón y col 2001).

#### 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son un término que incluye a los radicales libres como  $O_2 \bullet$  y  $OH\bullet$ , además de otras especies no radicáticas derivadas del oxígeno como peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete y ácido hipocloroso (HOCl) (**Cuadro 1**), que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes (Ray y col 2012). Las ROS por diferentes reacciones pueden interactuar con numerosos componentes celulares incluyendo ADN, proteínas y lípidos

**Cuadro 1.** Especies reactivas de oxígeno de interés biológico.

<b>Especies radicalarias</b>	<b>Especies no radicalarias (Oxidantes)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Radical anión superóxido</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Peróxido de hidrógeno</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Radical hidroxilo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ácido hipocloroso</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Radical peroxilo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anión peroxinitrito</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Radical alcoxilo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Oxígeno singulete</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Óxido nítrico</li></ul>	

Martínez- Sánchez (2005)

causando daño en su estructura y función (Bayr 2005).

#### **a. Daños por ROS a biomoléculas**

Bajo ciertas circunstancias las ROS son necesarias para el óptimo funcionamiento de algunos sistemas, sin embargo cuando se producen en grandes cantidades pueden ser peligrosas para el organismo (Durackova 2010). Las ROS atacan componentes celulares causando daño sobre lípidos, proteínas y ADN, los cuales pueden iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular (Cabrera y Serrano 2014).

. Primeramente, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los fosfolípidos que conforman la membrana celular son muy susceptibles al ataque de radicales libres, lo cual puede desencadenar la peroxidación lipídica, afectando la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Una vez que los radicales se han producido, se combinan con el oxígeno disuelto en la membrana para formar radical peroxilo, el cual puede atacar la membrana de proteína y ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, propagando la peroxidación lipídica de la membrana (Azad y col 2009).

Las proteínas, por su parte, presentan una química muy compleja ante el daño oxidativo generado por ROS (Vicedo Tomey y Vicedo Ortega 2000). La modificación en las proteínas inicia principalmente en reacciones con  $\text{OH} \bullet$ ; Sin embargo, el proceso oxidativo es determinado por la disponibilidad de  $\text{O}_2$  y el oxígeno singulete o

su forma protonada ( $\text{HO}_2$ ). Colectivamente, estos ROS dan lugar a la oxidación de las cadenas laterales de residuos de aminoácidos, la formación de enlaces cruzados proteína-proteína, y la oxidación de la cadena principal de la proteína, resultando en la fragmentación de la misma. Mientras tanto, se ha demostrado que otras formas de ROS pueden obtener productos similares y que los iones de metales en transición pueden sustituir a OH y oxígeno singulete en algunas de las reacciones (Gil y Tuteja 2010).

Finalmente, los daños al Ácido desoxirribonucleico (ADN) parecen ocurrir en todas las células aeróbicas. El cuerpo posee mecanismos de defensa para contrarrestar los ataques oxidativos al ADN usando enzimas reparadoras de ADN y/o antioxidantes. Sin embargo, si estos mecanismos fallan, el daño oxidativo puede inducir a una variedad de enfermedades crónicas y degenerativas así como el desarrollo del cáncer. Una forma común de daño es la formación de bases hidroxiladas de ADN, las cuales se consideran un factor importante en la química de la carcinogénesis e interfieren con el crecimiento normal de las células causando múltiples modificaciones en la estructura del ADN incluyendo lesiones de base y azúcar, roturas de cadena, enlaces cruzados entre ADN-proteína y sitios de base libre (Pham-Huy y col 2008).

El nivel de daño oxidativo al ADN parece estar fuertemente relacionado con la tasa metabólica así como el tipo de ADN en un amplio número de mamíferos. El ADN mitocondrial del hígado de ratas tiene 10 veces mayor daño oxidativo que el ADN nuclear del mismo tejido. Este incremento puede ser debido a la falta de enzimas

reparadoras en el ADN mitocondrial, falta de histonas protegiendo el ADN mitocondrial, y la proximidad del ADN a oxidantes generados durante la fosforilación oxidativa (Ames y col 1993).

## **2. Compuestos antioxidantes**

Un antioxidante es un compuesto químico que estando en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. También se pueden definir como compuestos que brindan protección al sistema celular de efectos potencialmente dañinos en los procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Posada y col 2003). Los organismos evolutivamente desarrollaron sistemas de defensa antioxidante para poder neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento. Este sistema de defensa antioxidante incluye antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no enzimático, que junto con antioxidantes exógenos, interactúan para mantener el equilibrio redox del organismo. (Bouayed y Bohn 2010). En el **Cuadro 2** se muestran los diferentes antioxidantes endógenos y exógenos.

Los antioxidantes endógenos son naturalmente producidos por el organismo mientras que los antioxidantes exógenos se adquieren principalmente a través de la dieta. Los principales antioxidantes exógenos son la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides y los polifenoles, y su papel fundamental es neutralizar el efecto de los ROS generados durante procesos metabolismos celulares que emplean oxígeno como la respiración mitocondrial, donde el 85% del oxígeno inhalado es metabolizado, y en

**Cuadro 2.** Clasificación de antioxidantes endógenos y exógenos

<b>Antioxidantes endógenos</b>	<b>Antioxidantes exógenos</b>
<u>Antioxidantes enzimáticos:</u> <ul style="list-style-type: none"><li>• Superóxido dismutasa (SOD)</li><li>• Glutatión peroxidasa</li><li>• Glutatión reductasa</li><li>• Glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa</li></ul>	<u>Antioxidantes dietarios de frutas, vegetales y granos</u> <ul style="list-style-type: none"><li>• Vitaminas: Vitamina C y E</li><li>• Elementos traza: zinc, selenio</li><li>• Carotenoides: beta caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina.</li><li>• Ácidos fenólicos: ácidosclorogénico, gálico, cafeíco etc.</li><li>• Flavonoles: Quercetina, kaempferol, miricetina y sus glucósidos.</li><li>• Flavanoles: proantocianidinas y catequinas.</li><li>• Antocianidinas: cianidina y pelargonidina</li><li>• Isoflavonas: Genisteína, daidzeína</li><li>• Flavanones: naringenina, eriodictiol y hesperetina</li></ul>
<u>Antioxidantes no – enzimáticos</u> <ul style="list-style-type: none"><li>• Glutatión (GSH),NADPH, coenzima</li><li>• Q, albumina, bilirrubina.</li></ul>	Flavones: luteolina y apigenina

(Bouayed 2010)

procesos catalizados por la NADPH oxidasa y xantina oxidasa. (Bouayed y Bohn 2010). Por lo tanto, los antioxidantes exógenos juegan un papel importante en la prevención del estrés oxidativo y su deficiencia es una de las numerosas causas de patologías crónicas y degenerativas (Pham-Huy y col 2008).

## **B. ENFERMEDADES CRONICO DEGENERATIVAS**

La organización Mundial de la Salud refiere que las enfermedades crónicas son de larga duración y por lo general de progresión lenta (OMS 2009). Se caracterizan típicamente por ausencia de microorganismo causal, factores de riesgo múltiples, latencia prolongada, larga duración con periodos de remisión y recurrencia, importancia de factores del estilo de vida, consecuencias a largo plazo (físicas y mentales) (Guevara-Gasca y Galán-Cuevas 2010).

Se incluyen dentro de este término a las cardiopatías (enfermedades cardiovasculares), cáncer, trastornos respiratorios crónicos, diabetes, trastornos de visión y audición. Se estima que el 75% de las muertes en México son causadas por enfermedades crónicas no transmisibles, siendo diabetes mellitus el primer lugar en mortalidad con un 17.5% según los datos reportados por el INEGI para el año 2015.

### **1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica caracterizada por la alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas donde el paciente cursa con hiperglucemia debido a resistencia a insulina o relativa falta de la

misma (Zhu y col 2015). La clasificación de DM incluye cuatro clases: DM tipo 1 (Destrucción de células  $\beta$  pancreáticas, usualmente dejando una absoluta deficiencia), DM tipo 2 (defecto progresivo de la secreción de insulina con antecedente de resistencia a esta hormona), DM gestacional (diagnosticada durante el embarazo), otros tipos específicos debido a otras causas (defectos genéticos en la funciones de las células  $\beta$  pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, inducida por tratamientos médicos para enfermedades como VIH o trasplante de órganos) (Isla 2012). Sin embargo, la mayoría de los casos se incluyen en DM tipo 1 y DM tipo 2, ésta última con la mayor prevalencia (Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal 2013).

La DM es una enfermedad crónica de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas, y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente, ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (Flowler 2008).

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país. Los datos de la ENSANUT 2016 reportan que el 9.4% de la población mexicana ha recibido ya un diagnóstico de diabetes, este porcentaje incrementó 0.2% con respecto a ENSANUT en su versión 2012.

En el estado de Sinaloa la prevalencia de DM por diagnóstico médico previo en personas de 20 años o más fue de 8.2%, mayor a la reportada en la ENSANUT 2006 (5.5%). La prevalencia de DM por diagnóstico médico previo fue ligeramente mayor

en mujeres (8.4%) que en hombres (7.9%). Tanto en hombres como en mujeres se observó un incremento en la prevalencia de diagnóstico previo de DM a partir del grupo de 40 a 59 años de edad (11.2 y 10.4%, respectivamente), la cual aumentó ligeramente en hombres de 60 años o más (24.8%) y también aumentó en mujeres de la misma edad (25.5%). El total de personas adultas con DM podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición (Romero-Martínez y col 2013).

#### **a. Tratamiento**

La hiperglucemia es el fenómeno central en todas las formas de DM y su mantenimiento prolongado se encuentra relacionado con complicaciones microvasculares (Retinopatía, nefropatía, daño a nervios) y macrovasculares (enfermedades cardiovasculares: ataque cardiaco, accidentes cerebrovasculares), por lo que el tratamiento de la DM debe estar encaminado a descender los niveles de glucemia a valores próximos a la normalidad (Torre y col 2011).

Existen diferentes esquemas de tratamiento para la DM. Por lo general se comienza con un tratamiento no farmacológico, el cual consiste en la modificación del estilo de vida (dieta y actividad física), y conlleva a la mejora de la resistencia a la insulina y secundariamente la capacidad secretora pancreática. Dado que los intentos de modificación de estilos de vida no inducen o mantienen un control de la glucemia adecuado en la mayoría de pacientes, la farmacoterapia es necesaria para evitar los riesgos inherentes al desarrollo de DM (Rey y col 2012).

## 1) Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la DM tipo 1 se basa en la administración de múltiples dosis de insulina que imitan el patrón fisiológico de secreción de la misma (Calvo y col 2006) mientras que tratamiento farmacológico inicial para la DM tipo 2 consiste en el uso de hipoglucemiantes orales (Rodríguez-Rivera y col 2017). La terapia involucra principalmente inductores de la secreción de insulina (secretagogos), sensibilizadores de la secreción de insulina e inhibidores enzimáticos (Balderas Rentería 2015).

Los secretagogos de insulina son agentes farmacológicos que actúan incrementando la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas, bloqueando los canales de potasio sensibles a ATP, provocando la liberación de insulina (González-Sánchez y Ortiz-Andrade 2012). Entre los fármacos que estimulan la secreción de insulina se encuentran las sulfonilúreas, secretagogos de acción rápida (glinidas), inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4) y análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).

Los fármacos sensibilizadores de la acción de la insulina presentan mecanismos muy variados, incrementando principalmente la sensibilidad de los tejidos diana (músculo e hígado) a la insulina. Dentro de este grupo se encuentran las biguanidas, derivados biguanídicos de los que el único actualmente aceptado y comercializado es la metformina, capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina, inhibir la neoglucogénesis hepática y favorecer la captación de glucosa por el tejido adiposo y muscular (González-Sánchez y Ortiz-Andrade 2012).

Por último, los inhibidores de las enzimas que participan en la digestión de carbohidratos pueden ser coadyuvantes en la disminución de la hiperglucemia postprandial en pacientes con diabetes, ya que son capaces bloquear la acción de enzimas como  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasas, que cumplen la función de hidrolizar los enlaces glucosídicos de polisacáridos hasta obtener monosacáridos, los cuales son rápidamente absorbidos y transportados a circulación sistémica aumentando la glucemia en sangre (Tormo y col 2004).

Actualmente existen tres agentes inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa obtenidos de forma sintética: la acarbosa, que fue la primera en ser comercializada, seguida del miglitol y voglibosa (Escorcía 2009). La acarbosa, interfiere en la absorción intestinal de los hidratos de carbono y disminuye la hiperglucemia postprandial al inhibir de forma competitiva la acción de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (glucoamilasa, sucrasa y maltasa) que desdoblan los oligosacáridos y polisacáridos. Los hidratos de carbono no digeridos son metabolizados por bacterias intestinales en el colon, con formación de ácidos grasos y diversos gases que producen efectos gastrointestinales adversos (Nijpels y col 2008).

Aunque la acarbosa, el miglitol y la voglibosa cumplen una función similar se diferencian por su estructura química y características farmacológicas. La acarbosa es un tetrasacárido no absorbible de origen microbiano. El miglitol es un derivado de la desoxinojirimicina, estructuralmente similar a los monosacáridos, que se absorbe en más del 60%, utilizando el mismo transportador intestinal que la glucosa, hecho que no ocurre con la acarbosa. El miglitol no se metaboliza después de su absorción

y se elimina rápidamente por vía renal (Escorcia 2009). La voglibosa tiene un efecto menos potente en reducir la hiperglucemia postprandial sin embargo tiene ventaja en ocasionar menos efectos gastrointestinales (Konya y col 2013).

Los efectos adversos asociados a estos fármacos son generalmente alteraciones gastrointestinales como flatulencia, diarrea o dolor abdominal. La intensidad se relaciona con la dosis y se acentúa por el consumo de hidratos de carbono simples, suelen aparecer al principio del tratamiento, disminuyendo con el tiempo y desapareciendo con la retirada del fármaco o con un ajuste de dosis (Salaverría-de Sanz 2012).

Actualmente podemos encontrar inhibidores de enzimas glucosidasas obtenidos de forma sintética, sin embargo estos inhibidores enzimáticos también pueden encontrarse de forma natural en plantas y alimentos de origen vegetal. El consumo de estos inhibidores enzimáticos de origen natural puede ser una opción para la reducción de hiperglucemia postprandial así como reducir el riesgo de los efectos adversos de los fármacos.

## **2) Alternativas para el control de la glucemia**

El reino vegetal es un amplio campo de búsqueda para agentes hipoglucemiantes de origen natural, que pudieran ser libres de efectos secundarios. Es por ello que inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de fuentes naturales ofrecen una atractiva estrategia para el control de la hiperglicemia (Tundis y col 2010).

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos de los alimentos funcionales que muestran propiedades farmacológicas. Dentro de estos compuestos bioactivos se encuentran los fitoestrógenos que han mostrado efectos benéficos contra la obesidad y la diabetes (Serrano y col 2006). Otros fitoquímicos como los compuestos polifenólicos han mostrado asociación positiva con la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -amilasa. McCue y Shetty (2004) evaluaron el efecto de extractos de hierbas con distintas concentraciones de ácido rosmarínico y del ácido rosmarínico puro sobre la actividad de amilasa pancreática porcina, encontrando una relación dosis-dependiente con la actividad de amilasa para el ácido rosmarínico puro, mientras que un extracto a base de orégano con solo 7% de ácido rosmarínico mostró cerca del 50% de inhibición de la enzima sugiriendo que otros compuestos fenólicos presentes en el extracto (ácido protocatecuico, ácido cafeíco, ácido cumárico, quercetina) pudieron ejercer un efecto sinérgico y obtener así alta inhibición de amilasa.

Habtemariams (2011) midió la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por efecto de kaempferol-3-O-rutinosido, resultando un potente inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* con 8 veces más actividad que el medicamento comercial acarbosa, además kaempferol-3-O-rutinosido mostró efecto sinérgico con otros flavonoides como agliconas de kaempferol y quercetina.

## **C. ALIMENTOS FUNCIONALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS**

### **1. Alimentos funcionales**

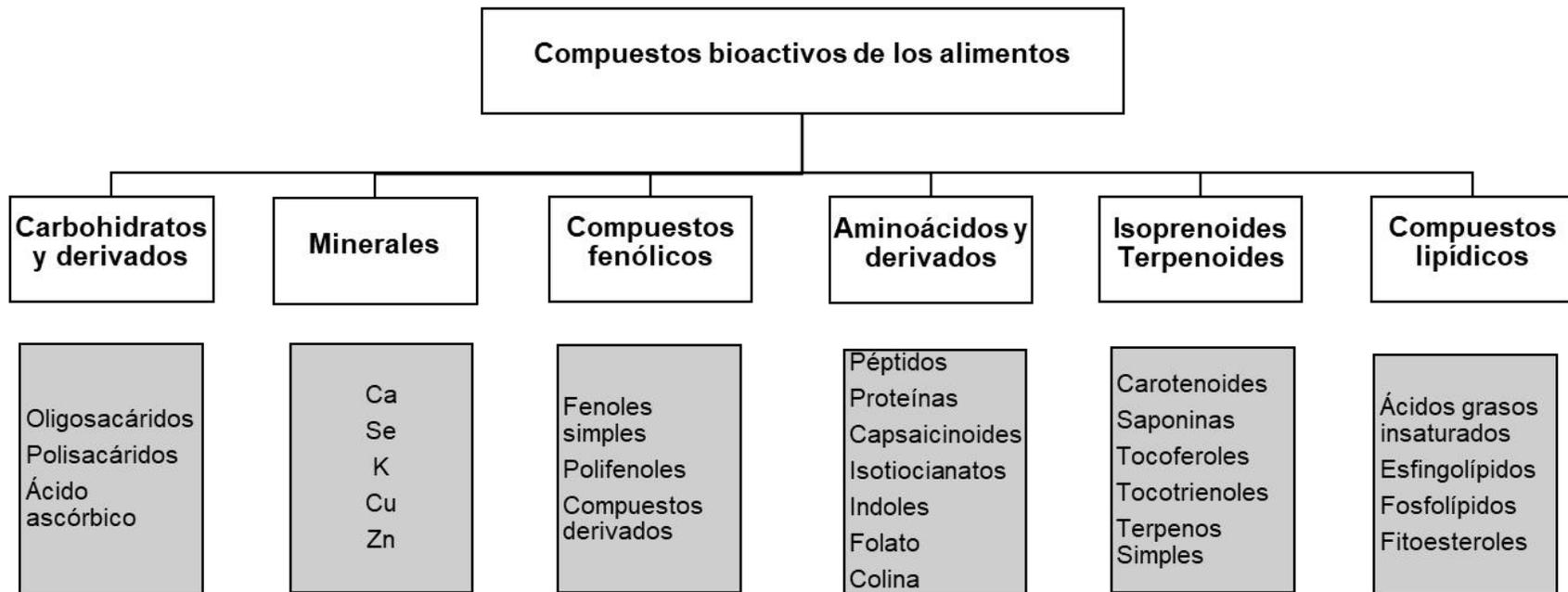
Los alimentos funcionales son aquellos que además de su composición nutrimental poseen componentes bioactivos capaces de proveer un beneficio a la salud y/o prevenir enfermedades. Un alimento funcional puede ser similar en apariencia de un alimento convencional pero que se consume de manera inusual en la dieta y está demostrado que tiene beneficios fisiológicos reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas más allá de su función nutricional básica. Cuando un alimento funcional ayuda en la prevención o tratamiento de enfermedades o desordenes es llamado nutracéutico (Cencic y Chingwaru 2010).

### **2. Compuestos bioactivos en alimentos**

Los compuestos bioactivos no poseen una función en la nutrición básica, sin embargo brindan actividades biológicas dentro del organismo ya que se encuentran relacionados en diferentes procesos metabólicos (Herrera-Chalé y col 2014).

Los diferentes compuestos bioactivos poseen estructuras y actividades biológicas muy diferentes, en base a esto pueden clasificarse en diferentes categorías como se muestra en la **Figura 1**.

Los niveles de los compuestos bioactivos dentro de los productos vegetales se ven afectados por diversos factores. La concentración de estos compuestos dependerá de los aspectos agronómicos como el tipo y zona de cultivo, tipo de suelo y clima, los cuales afectan la composición de compuestos fenólicos.



**Figura 1.** Compuestos bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal (García-Salas 2016).

Además el proceso de conservación y el tipo de procesado de estos alimentos hacen que la composición de compuestos bioactivos varíe considerablemente (Tierno y col 2015).

#### **a. Compuestos fenólicos**

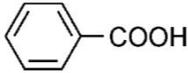
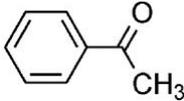
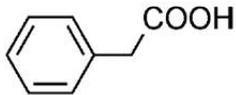
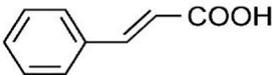
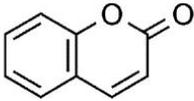
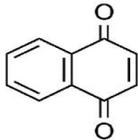
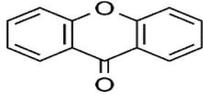
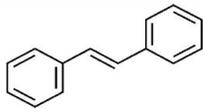
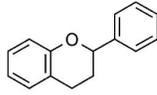
Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, en las cuales participan poco o no participan en la fotosíntesis, respiración o crecimiento y desarrollo, son encontrados en altas concentraciones en la planta. Constituyen uno de los grupos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se conocen más de 8000 estructuras fenólicas con diferentes actividades biológicas, encontradas en alimentos como frutas, verduras, cereales, especias, hierbas, frutos secos, legumbres y bebidas (Contreras-Gámez y col 2014).

Los fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos. Pueden ser clasificados por el número y acomodo de sus átomos de carbono (**Cuadro 3**) y se encuentran comúnmente conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. Los fenólicos se agrupan en dos grandes grupos, los compuestos flavonoides y los no flavonoides.

##### **1) Flavonoides**

Son compuestos polifenólicos que comprometen 15 carbonos con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos C6-C3-C6. Las principales sub-clases de flavonoides dietarios son flavonoles, flavones, flavan-3-oles, antocianidinas, flavanones e isoflavonas.

**Cuadro 3.** Esqueletos estructurales básicos de compuestos fenólicos y polifenólicos.

Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub></b>	Ácidos fenólicos	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub></b>	Acetofenonas	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub></b>	Ácido fenilacético	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>	Ácidos hidroxicinámicos	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>	Cumarinas	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub></b>	Naftoquinonas	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub></b>	Xantonas	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub></b>	Estilbenos	
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub></b>	Flavonoides	

(Crozier y col 2009).

El esqueleto básico de los flavonoides puede tener números sustituyentes, grupos hidroxilos y azúcares, de hecho la mayoría de los flavonoides existen naturalmente como glucósidos. Los grupos hidroxilos y azúcares incrementan la solubilidad de flavonoides en agua y otros sustituyentes como grupos metilo los hacen más lipofílicos (Crozier y col 2009).

## 2) No-flavonoides

Los principales compuestos no flavonoides son los ácidos fenólicos, derivados de los ácidos benzoico y cinámico. Los derivados de ácidos hidroxibenzoicos incluyen el ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, entre otros; los derivados de ácidos hidroxicinámicos son ácido *p*-cumárico, ácido cafeíco, ácido ferúlico y ácido sinápico, predominando el ácido cafeíco. Estos ocurren como conjugados, por ejemplo el ácido tartárico o ácido quínico, llamados también ácidos clorogénicos (Vermerrys y Nicholson 2008)

### D. FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la especie más conocida del género *Phaseolus* en la familia *Fabaceae* conformada por más de más de 50 especies de plantas, de toda la América nativa (Singh y col 1991). Tiene su centro de origen en la región de Mesoamérica, particularmente en el occidente y sur de México (desde Jalisco hasta Oaxaca), y dos centros de domesticación: uno primario (Mesoamérica) y otro secundario (Sur Andino) (Hernández-López y col 2013).

## 1. Estructura del grano

El grano de frijol en su parte externa está compuesto por la testa o cubierta la cual corresponde a la capa secundaria del óvulo que es dura, seca y usualmente lisa, formada por una cutícula delgada que cubre una pared de células prismáticas contiguas denominadas palizada de células. El hilum, es el que conecta la semilla con la placenta. El micrópilo, es una abertura en la cubierta cerca del hilum. El rafe, proviene de la soldadura del funículo con los tegumentos externos de óvulo (**Figura 2**). (Arias 1993).

Su constitución interna lo integra el embrión, el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula. El complejo plúmula-radícula está situado entre los dos cotiledones, aun lado del grano contra la testa, de tal manera que la radícula está en contacto con el micrópilo y la lúmula está encerrada hacia el interior del grano (Arias 1993). En el grano seco, el complejo plúmula-radícula ocupa solamente una parte muy reducida del espacio libre entre los cotiledones. Los cotiledones exhiben una estructura altamente organizada. Contiene células parenquimatosas unidas por una pared celular distinta y la lamela media. Estas células contienen gránulos de almidón elípticos embebidos en una matriz proteínica consistentes de cuerpos proteínicos y gránulos de aleurona. Los cuerpos proteínicos son generalmente esféricos y relativamente menores que los gránulos de almidón y están rodeados por una membrana lipoproteíca. Con base en la materia seca, la testa representa el 9%, los cotiledones un 90% y el 1% restante del embrión, de la semilla entera.

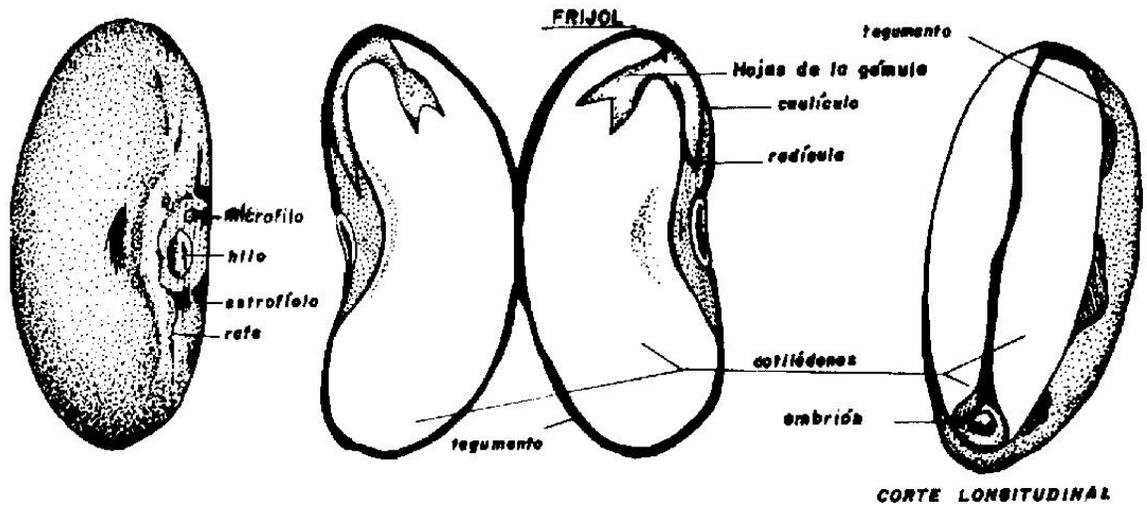


Figura 2. Estructura del grano de frijol común (FAO 1993)

## 2. Producción

Los frijoles son el principal ingrediente en alimentos tradicionales de todo el mundo, los que incluyen la India, México, África y en el centro y sur de América (Reddy y col 1984). En cuanto a su producción el continente asiático es el mayor productor de frijol contando con el 45.6% de la producción mundial, seguido por el continente Americano que representó el 26.1%. México ocupó el séptimo lugar dentro de los países productores de frijol, con una producción de 1, 088,767 Toneladas (**Figura 3**). Es importante mencionar que en el año 2014 México ocupaba el cuarto lugar dentro de los países con mayor producción a nivel mundial (FAOSTAT).

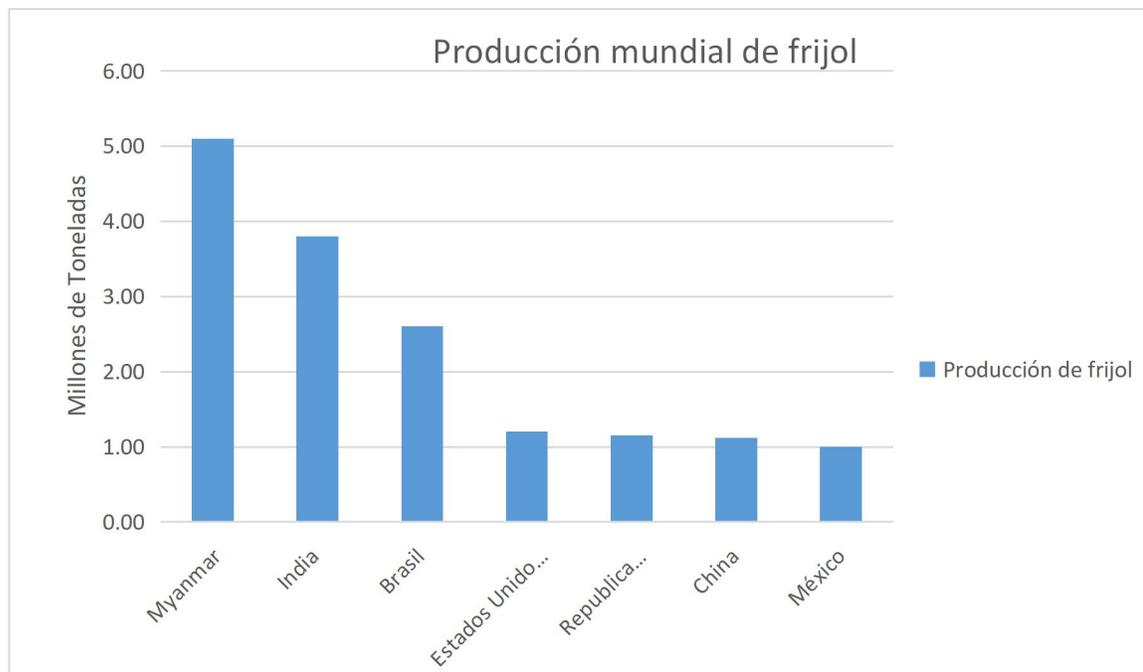
Sinaloa es el segundo estado con mayor producción en México, en primer lugar se encuentra Zacatecas, seguido de Sinaloa y Chihuahua (SIAP 2017) (**Cuadro 4**).

## 3. Composición química

El grano de frijol presenta un alto contenido de proteína en base seca que oscila entre un 16 y un 33%. Es un alimento de alto valor energético pues contiene alrededor del 70% de carbohidratos totales. Este grano aporta además una cantidad importante de vitaminas y minerales (**Cuadro 5**). Adicionalmente, el grano de frijol posee algunos compuestos bioactivos con potencial benéfico en la salud.

### a. Proteínas

Las variedades de *P. vulgaris L.* más consumidas en Latinoamérica, presentan un contenido de proteína promedio del 20%, con un intervalo de variación del 19.3 al 35.2%. Sotelo y col (1995) analizaron el contenido de proteínas de frijol salvaje y frijol



**Figura 3.** Producción Mundial de Frijol. FAOSTAT (2016).

**Cuadro 4.** Principales estados productores de frijol en México.

Estado	Producción (Toneladas)
Zacatecas	306,366
Sinaloa	157,992
Chihuahua	84,366
Durango	71,720
Nayarit	60,304

Fuente: SIAP (2017)

<b>Característica</b>	<b>Contenido</b>	<b>Requerimiento mínimo diario</b>
<b>Composición química (%)</b>		
Proteína	14-33	
Lípidos	1.5-6.2	
Fibra total	14-19	
Insoluble	10.1-13.4	
Soluble	3.1-7.6	
Cenizas	2.9-4.5	
Carbohidratos	52-76	
<b>Calidad de la proteína</b>		
Digestibilidad (%)	52-75	
Relación de la eficiencia proteínica	0.7-1.5	
<b>Aminoácidos esenciales (g/100 g proteína)</b>		
Fenilalanina + Tirosina	5.3-8.2	6.3
Isoleucina	2.8-5.8	2.8
Leucina	4.9-9.9	6.6
Lisina	6.4-7.6	5.8
Metionina + cisteína	1.2-1.5	2.5
Treonina	4.4-7.0	3.4
Triptófano	-	1.1
Valina	4.5-6.7	3.5
<b>Minerales (mg/100 g)</b>		
Calcio	9-200	800-1000
Fósforo	460	800-1000
Hierro	3.8-7.6	15
Magnesio	200	300-400
Zinc	2.2-4.4	15
<b>Vitaminas (mg/100 g)</b>		
Tiamina (B1)	0.86-1.14	1.5
Niacina	1.16-2.68	0.019
Ácido fólico	0.17-0.58	0.4
<b>Anti nutricionales</b>		
Oligosacáridos (mg/g)	25-50	
Taninos (mgeq.cat/g)	9.6-131.4	

Inhibidores de tripsina (UIT/mg)	13-29
Ácido fítico (%)	0.6-2.7
Lectinas (%)	1-5

**Cuadro 5.** Composición química del grano de frijol

Fuentes: (Reyes-Moreno y Paredes-López 1993; Paredes-López 1998; Young y col 2001).

cultivado encontrando un promedio en el contenido de proteína de 25.73 y 21.78 g de muestra en base seca respectivamente.

**1) Calidad de la proteína**

El valor nutrimental de la proteína depende de su capacidad de proveer nitrógeno y aminoácidos en adecuadas cantidades para cumplir los requerimientos del organismo. En este sentido, la proteína del frijol presenta un alto contenido de lisina (6.4-7.6 g/ 100 g de proteína) y de fenilalanina más tirosina (5.3-8.2 g/100 g proteína), es decir, satisface todos los requerimientos mínimos recomendados por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) o por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Mederos 2013); sin embargo, el frijol es deficiente en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Reyes-Moreno y col 1993).

A pesar de que el grano de frijol representa una importante fuente de proteínas, éstos no están 100% disponibles para el uso del organismo. La baja calidad proteica del frijol es atribuida a diversos factores como: estructura compacta de las proteínas, que puede resistir al proceso de proteólisis; factores antinutricionales los cuales modifican la digestibilidad, alterando la liberación de aminoácidos y la alta excreción

de nitrógeno endógeno. Entre los llamados factores antinutricionales podemos incluir a los oligosacáridos, taninos, inhibidores de tripsina, inhibidores de proteasa, las lectinas y el ácido fítico, que se relaciona con la baja digestibilidad de la proteína y reducción de la biodisponibilidad de los minerales, entre otros. A pesar de los efectos negativos de los factores antinutricionales, la evidencia científica ha demostrado su papel benéfico en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (Mederos 2013).

La fracción de carbohidratos de las legumbres incluye monosacáridos (ribosa, glucosa, galactosa, y fructosa), disacáridos (sacarosa y maltosa) la fracción soluble de azúcares, y oligosacáridos como la familia de la farinosa (farinosa, estaqueos y verbascosa), además de celulosa, lignina, pectina, galactosa, arabinosa, xilosa y mucosa, mismas que algunos autores clasifican con fibra dietética o carbohidratos no digeribles. Debido a esta última fracción los carbohidratos del frijol son de absorción lenta. Este tipo de carbohidratos son benéficos para la salud, por su bajo índice glucémico tienen el potencial de disminuir las concentraciones de colesterol sérico (Bravo y col 1998).

## **b. Carbohidratos**

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios del frijol los cuales representan alrededor del 70% del peso del grano. El almidón es el carbohidrato más abundante, llegando a representar más del 50 % del peso del grano. El frijol además contiene una cantidad importante de fibra dietaria, predominando la fibra insoluble

(20%), mientras que fibra soluble solo representa pequeña fracción de este componente (2.5%) (Almeida-Costa y col 2006).

### **c. Lípidos**

El contenido de lípidos del frijol es bajo. Dentro de los macronutrientes del frijol la fracción correspondiente a los lípidos es la más pequeña y está formada por una mezcla de acilglicéridos cuyos ácidos grasos predominantes son los mono y poliinsaturados (Ramírez y Rangel 2011). Campos-Vega y col (2009) evaluaron la composición química de diferentes granos de frijol encontrando una variación de lípidos en frijol crudo de 0.8 hasta 2.0 % en base seca.

### **d. Vitaminas y minerales**

Las vitaminas que se han reportado en frijol son folatos, tocoferoles, tiamina, riboflavina, niacina, biotina y piridoxina. Algunas de estas vitaminas cumplen el 95% de los requerimientos diarios. Tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y el contenido de ácido fólico en frijol crudo están en el rango de 0.81 -1.32, 0.112-0.411, 0.85-3.21, 0.299-0.659 and 0.148-0.676 mg/100g, respectivamente (Campos-Vega y col 2010). El contenido de vitaminas varía en las diferentes clases de frijol (Hayat y col 2014).

El frijol brinda un importante aporte de hierro, fósforo, magnesio, manganeso y en menor medida zinc, cobre y calcio (Hayat y col 2014). Velasco-González y col (2013) analizaron las propiedades físicas y químicas de diferentes variedades de frijol, encontraron minerales como Ca, Mg, Na, K, siendo estos similares entre las distintas variedades.

## **e. Compuestos bioactivos**

El frijol, al igual que otras leguminosas, contiene compuestos bioactivos como inhibidores de enzimas digestivas, lectinas, fitatos, oligosacáridos y compuestos fenólicos (Campos-Vega y col 2010). Dentro de los compuestos fenólicos en el frijol se incluyen variedades de flavonoides como antocianinas, flavanoles, flavonoles, proantocianidinas, taninos, glucósidos así como también un amplio rango de ácidos fenólicos (**Cuadro 6**) (Lin y col 2008; Ross y col 2009; Abu-Reidah y col 2013).

### **1) Ácidos fenólicos**

En los granos de frijol se han reportado ácidos fenólicos de dos clases: derivados de ácido hidroxibenzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanillico y ácido gálico) y derivados de ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido gálico) (Ross y col 2009).

### **2) Flavonoides**

Los flavonoides detectados en frijol incluyen flavonoles como miricetina, quercetina y kaempferol, estos últimos siendo los más abundantes con sus respectivos glucósidos (Mujica y col 2012); flavanoles como catequina; Antocianinas incluyendo delphinidina, petunidina, malvinidina, cianidina y pelargonidina con sus respectivos glucósidos (solo reportadas en frijoles con testas coloreadas) (Lin y col 2008) (**Figura 4**).

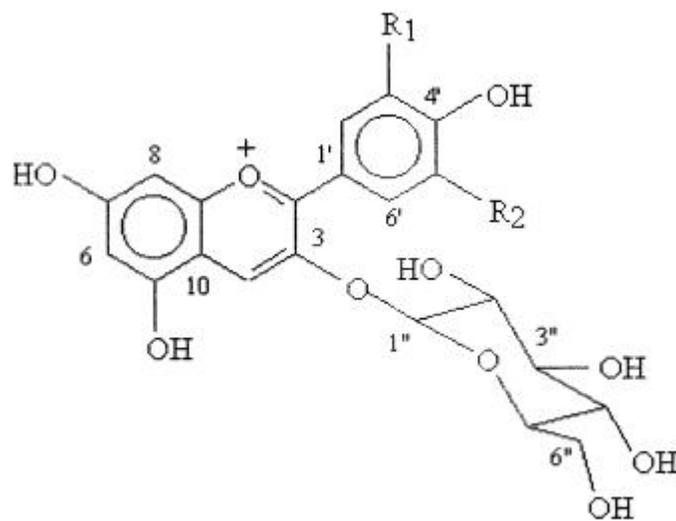
### 3) Isoflavonas

El frijol común no es reconocido por ser fuente de isoflavonas, la soya es la única legumbre con alto contenido de isoflavonas (genisteína, daidzeína). Sin embargo, ambas leguminosas tienen capacidad de fijar nitrógeno, proceso mediado por bacteria *rhizobia* atraído por isoflavonas y cumestrol en la raíz, debido a esto Díaz-Batalla y col (2006) reportaron isoflavonas en frijol común posteriormente al proceso de germinación.

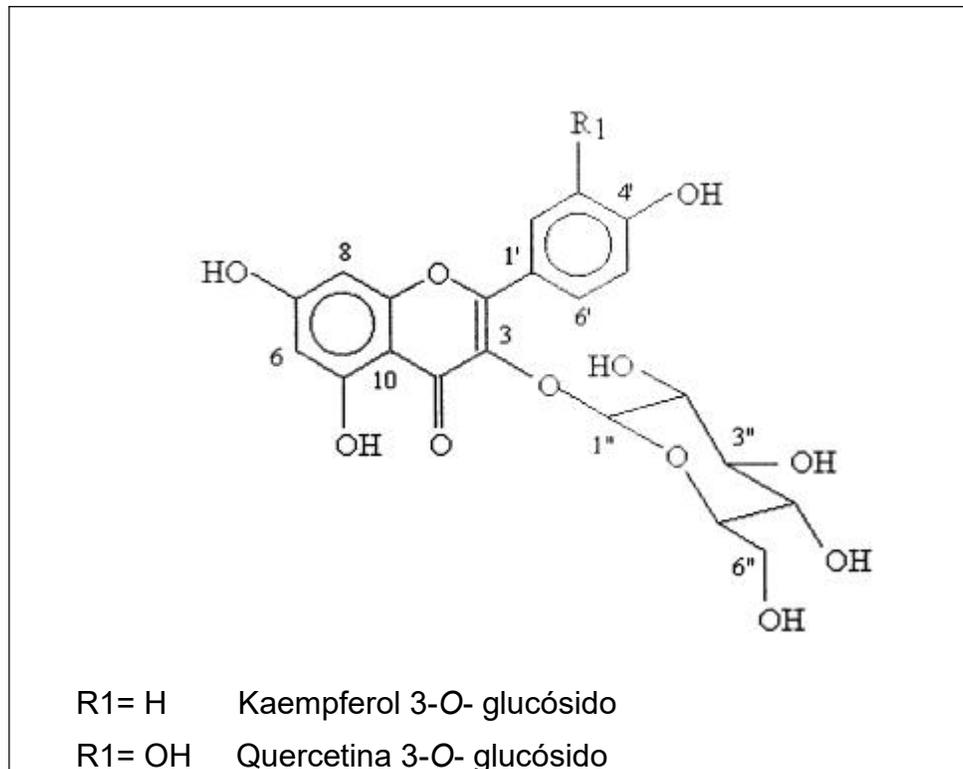
**Cuadro 6.** Compuestos fenólicos presentes en frijol común

<b>Fitoquímicos</b>	<b>Contenido</b>
Polifenoles totales (% bs <sup>1</sup> )	0.10 – 0.5
Ác. <i>p</i> -Hidroxibenzoico (µg/g bs)	10.1
Ác. Ferúlico (µg/g bs)	24.0
Ác. <i>p</i> -Cumárico (µg/g bs)	5.4
Catequina (mg/100g bs)	61.0
Antocianinas (mg/100g bs)	45.0
Isoflavonas (mg g <sup>-1</sup> )	100 – 700
Daidzeina (mg g <sup>-1</sup> )	1 – 4
Genisteína (mg g <sup>-1</sup> )	1 – 52
Lignanós (mg g <sup>-1</sup> )	30
Taninos (% bs)	0.0 – 0.7
<b>Otros</b>	
Inhibidores de tripsina (mg/100g bs)	7.0
Ácido fítico (mg/100g bs)	3.0
Saponinas (mg/100g bs)	56.0

<sup>1</sup> Bs: Base seca. Adaptado de (Atchibri y col 2010; Campos-Vega y col 2010).



R1= R2= OH	Delfinidina 3-O- glucósido
R1= OCH <sub>3</sub> , R2= OH	Petunidina 3-O- glucósido
R1= R2 = OCH <sub>3</sub>	Malvidina 3-O- glucósido



**Figura 4.** Estructura flavonoides en *Phaseolus vulgaris* L. Parte superior antocianinas, parte inferior glucósidos de flavonol. Fuente: (Beninger y Hosfield 2003)

#### 4. Propiedades nutraceuticas

El consumo de frijol, o de extractos obtenidos a partir del mismo, se ha relacionado con la mejora en la sintomatología de algunas enfermedades crónicas, principalmente obesidad y diabetes (Preuss 2009). Otros efectos benéficos a la salud a los que se ha asociado el consumo de frijol son la reducción del colesterol en sangre, mejora en la tolerancia a la glucosa, reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares y prevención de ciertos tipos de cáncer (Aparicio Fernandez y col 2008; Xu y col 2011). Los efectos benéficos asociados al consumo de frijol pueden ser atribuidos a la presencia de compuestos bioactivos, incluidos compuestos fenólicos (Luthria y Pastor-Corrales 2006). Estos compuestos son de gran interés,

pues además de su reconocida capacidad antioxidante también se han relacionado con la actividad hipoglucemiante de esta leguminosa.

#### **a. Actividad antioxidante**

Los extractos de frijol común, especialmente los obtenidos a partir de la cascara, poseen actividad antioxidante (Oomah y col 2010). La mayoría de los antioxidantes presentes en frijol son compuestos fenólicos de tipo flavonoide como antocianinas, glucósidos de quercetina, kaempferol y proantocianidinas (taninos condensados) (Aparicio-Fernández y col 2005). Estos compuestos han mostrado poseer una capacidad antioxidante significativamente mayor a la capacidad antioxidante del BHT (butilato de hidroxitolueno), un antioxidante comercial empleado en alimentos (Beninger y Hosfield 2003).

#### **b. Actividad hipoglucemiante**

El frijol común (*P.vulgaris* L) tiene un lugar notable a través del mundo, ésta presente en muchas culturas, y es reconocido por su actividad antidiabética. Diversos estudios han mencionado la capacidad antidiabética de *P. vulgaris*. Se ha encontrado que diferentes dosis de frijol común tienen potencial antihiper glucémico atribuido a sus a sus fitoconstituyentes; , alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides y saponinas (Mishra y col 2010). También se ha reportado que la administración de extractos acuosos o etanólicos de la vaina de frijol tiene efectos hipoglucémico e hipolipidémico, en los cuales los extractos incrementaron los niveles de insulina y disminuyeron la actividad de enzimas gluconeogénicas en hígado (Pari y Venkateswaran 2003).

Atchibri y col (2010) analizaron el efecto antidiabético de frijol común a diferentes dosis en ratas tanto normales como diabéticas, los niveles de glucosa fueron medidos cada hora durante 6 horas. El máximo efecto antidiabético se llevó a cabo en ratas diabéticas a dosis de 300 g/Kg en base húmeda después de la tercera hora.

## **E. FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (FES)**

Existen diversos procesos que son capaces de incrementar el valor nutricional y las propiedades nutraceuticas de las leguminosas, incluido el frijol. Entre estos procesos se encuentra la germinación, la extrusión y la fermentación en estado sólido (FES) (Dueñas y col 2015; Sánchez-Magaña y col 2014; Rochín-Medina y col 2015).

La FES o cultivo en estado sólido es definido como el cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida en la ausencia de agua libre (Lonsane y col 1985), es la técnica de conversión de sustratos complejos en compuestos simples. La FES ha sido ampliamente usada desde la antigüedad para la producción de alimentos fermentados como salsa de soya (Barrios-González 2012),

### **1. Tempe**

El Tempe consiste en la fermentación de la soya por hongos del género *Rhizopus*, específicamente se emplean *R. oryzae* y *R. oligosporus*. La actividad enzimática de este moho que interviene en la fermentación, reblandece las semillas y el crecimiento

del micelio las aglomera, dando lugar a una torta sólida. Esta fermentación cambia la textura y el sabor de la semilla de soya, al mismo tiempo provoca cambios complejos en el valor nutritivo del producto debido a que cambia el contenido proteico, de lípidos, carbohidratos y liberación de vitaminas contribuyendo a mejorar el valor nutritivo del producto (Nout y Rombouts 1990).

#### **a. Sustratos utilizados en la elaboración de Tempe**

El frijol de soya es el sustrato más común para la elaboración de Tempe, sin embargo se han utilizado diversos materiales como sustrato para su elaboración, alguno de estos sustratos son diversas leguminosas, garbanzo, frijol común, frijol sesban, frijol terciopelo, frijol alado, guisante amarillo y cereales como cebada, trigo (Nout y Rombouts 1990).

#### **b. Microorganismos utilizados en la producción de Tempe**

Debido a las bajas cantidades de líquido en los sustratos para la fermentación en estado sólido, la gran mayoría de los procesos se realizan con hongos, aunque existen procesos en los que se incluyen bacterias y levaduras (**Cuadro 7**). En cuanto a las bacterias *Klebsiella pneumoniae* es la predominante, esta bacteria no es esencial para la producción del Tempe, pero produce vitamina B12, es por esto que se recomienda su inoculación en Tempe que formaran parte de dietas veganas. Algo importante de mencionar es que *klebsiella* no interfiere con el crecimiento de hongos (Garibay y col 1993). La ventaja de utilizar hongos es que estos crecen en el medio

solido produciendo proteína a partir del consumo del sustrato, adicionado con fuentes inorgánicas de nitrógeno y otros minerales. Otra ventaja es el bajo contenido que poseen en ácidos nucleicos al compararlos con las bacterias y las levaduras (Quilantán y Manuel 1996).

### 1) Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos para la elaboración de FES. Los hongos utilizados incluyen especies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Trichoderma reesi*. Los hongos filamentosos tienen la capacidad de adaptarse y dispersarse para penetrar los sustratos sólidos. En superficies solidas los hongos producen colonias las cuales se dispersan radialmente debido a su extensión en forma de hifas. En la FES las colonias que surgen a partir de esporas adyacentes, son fusionadas y entonces aumenta la

**Cuadro 7.** Microorganismos / condiciones para la fermentación en estado sólido

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Proceso/producto</b>
<i>Aspergillus spp.</i>	Almidón	Enriquecimiento proteico
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de plátano	Proteína
	Maíz	Koji, etanol
	Yuca	Cinética de crecimiento

	Cáscara de cítricos	Enriquecimiento proteico Cinéticas de crecimiento
<b><i>Aspergillus oryzae</i></b>	Arroz	Alcohol, aldehídos Cetonas, koji, miso
<b><i>Rhizopus oligosporus</i></b>	Yuca Soya Frijol Garbanzo	Cinéticas de crecimiento Tempe Alimento proteico
<b><i>Rhizopus oryzae</i></b>	Yuca	Proteína
<b><i>Trichoderma viridae</i></b>	Salvado de trigo	Proteína, enzimas

(Pandey y col 2000)

densidad de hifas dentro del micelio. La densidad del micelio va a depender de la disponibilidad de nutrimentos (Mitchell y col 2002).

**a) *Rhizopus oligosporus***

*Rhizopus oligosporus* es utilizado en la producción de alimentos como el Tempe. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C y la de esporulación 41°C, sin exceso de oxígeno y humedad. El crecimiento es mejor en pHs ácidos, aunque es afectado en valores por debajo de 3.5. La atmosfera óptima debe contener un 20 %

de oxígeno y menos del 5 % de CO<sub>2</sub>. En la elaboración de Tempe puede coexistir con diferentes microorganismos tales como el *Lactobacillus plantaru*. Estos factores son responsables de la calidad de los productos y de su velocidad de formación (Eduar 2015).

Este microorganismos pertenece al reino Fungi, phylum Zygomycota, orden mucorales, familia mucoraceae, genero *Rhizopus*. Algunas de sus características morfológicas ayudan en la diferenciación entre dichas especies. Las hifas pueden ser o no septadas (6-15 μ de diámetro).

El crecimiento de las hifas proporciona al hongo la capacidad de penetrar en la mayoría de los sustratos solidos hasta 1 mm o 25% del cotiledón, manteniéndolos unidos secretando en la punta de la hifa las enzimas hidrolíticas que penetran directamente el sustrato. Estos hongos tienen la capacidad de crecer rápidamente a temperaturas relativamente altas (37 -45 °C y condiciones de humedad bajas (60-80%) (Hutkins 2006).

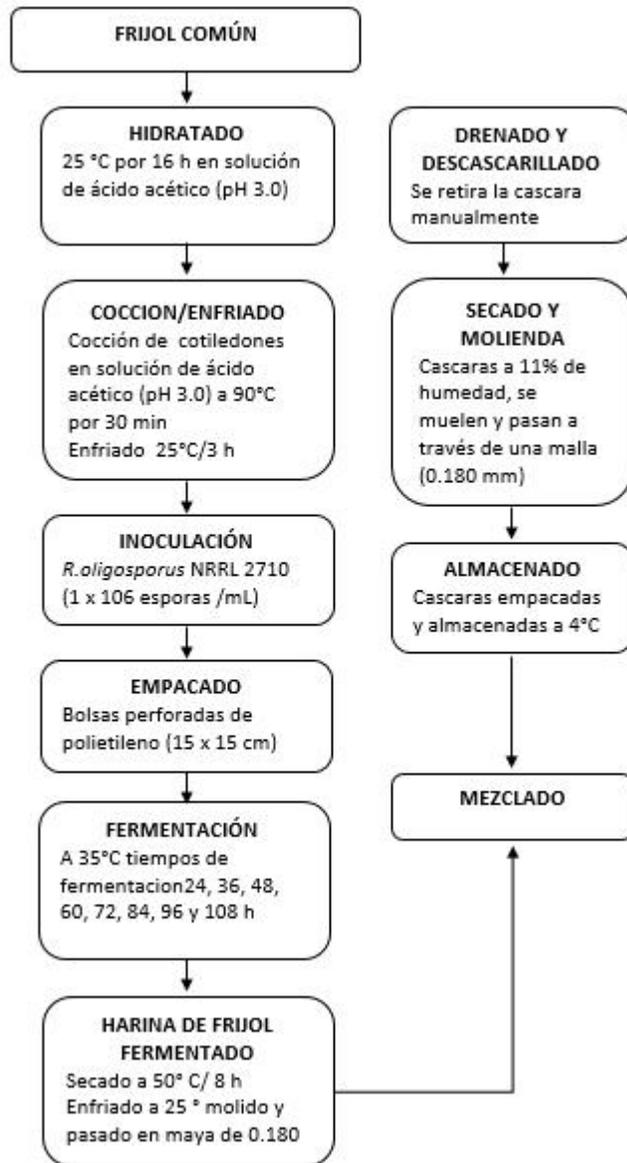
### **c. Proceso para la elaboración de Tempe**

El proceso involucrado en la producción de tempe difiere considerablemente entre diferentes lugares y países (Nout y Kiers, 2005). Sin embargo, durante su elaboración, el grano es sometido a etapas previas y a una etapa de fermentación en estado sólido, siendo la duración y características de estas etapas las que varían en función del sustrato utilizado (Roubos-van den Hil y col 2010).

Los pasos generales para la elaboración de Tempe se mencionan a continuación y su secuencia se ilustran en la **Figura 5**.

### **1) Limpieza / remojo / descascarillado**

Es necesario realizar la limpieza con el objetivo de eliminar materia ajena al grano o granos dañados. Posterior a la limpieza se procede a remojar los granos por 12 o 15 horas a temperatura ambiente, lo que facilita la penetración del micelio. Durante la fermentación ácida bacteriana, el pH de los granos disminuye de 5.3 a 4.5, previniendo bacterias no deseadas sin afectar el crecimiento de *Rhizopus*. El crecimiento del hongo es estable de un pH mayor a 3.5 y más lento cuando se acidifica a pH más altos. Como el hongo no puede crecer en el grano entero, es necesario un paso previo de descascarillado que puede ser manual, o por abrasión mecánica, facilitando el acceso del hongo a los nutrientes del sustrato.



**Figura 5.** Diagrama de flujo de para la fermentación en estado sólido de frijol común. Fuente: Reyes-Moreno (2004), modificado por Guzmán- Uriarte (2013).

## **2) Cocción parcial / drenado / enfriado**

Se requiere cocer parcialmente por un tiempo de 10 min a 3 h, a temperatura de ebullición, esto con el fin de eliminar bacterias que puedan interferir con la fermentación, destruir factores antinutricionales y liberar los nutrientes requeridos para el crecimiento del hongo. El agua de cocción es retirada y los cotiledones son extendidos en bandejas de bambú, mallas de alambre o cestos perforados. Este último paso es indispensable para eliminar el exceso de agua pues esto provocaría el crecimiento de bacterias, deterioro del Tempe, y menor vida de anaquel.

En este paso es importante mencionar que diversos autores han reportado una pérdida importante de compuestos fenólicos durante el paso de remojo y la cocción, en el proceso de remojo el agua entra al grano por absorción molecular, absorción capilar e hidratación, brindando un incremento de volumen en el grano. La reducción de compuestos fenólicos puede ser atribuida a la lixiviación de fenólicos en el medio de remojo (Xu y Chang 2008).

## **3) Inoculación**

La fuente de inoculación puede ser obtenida de 2 maneras, la primera es por un lote previo de Tempe y la segunda por sepas puras del hongo a utilizar. Con el objetivo de conseguir una fermentación rápida y óptima, Wang y col (1975) sugieren que inocular con  $1 \times 10^6$  esporas a 100 g de sustrato cocido produce resultados satisfactorios. Los hongos son los más utilizados para elaborar Tempe entre ellos *Rhizopus oligosporus* es ampliamente empleado por su fuerte actividad de lipasas y

proteasas. Sin embargo, otras especies como *R. oryzae*, *R. chinensis*, y *R. stonifer* también han sido utilizados en la producción.

#### **4) Contenedores de FES / Incubación**

Tradicionalmente, los granos son empacados en hojas marchitas de plátano perforadas que permiten suministro limitado de aire. Un contenedor será apropiado si permite el paso de oxígeno necesario para el crecimiento del hongo, pero no demasiado que permita la esporulación y oscurecimiento del micelio, la temperatura puede ser controlada, el sustrato retiene la humedad durante la fermentación, no existe agua libre en contacto con el grano y la fermentación ocurre en condiciones higiénicas, hoy en día, se utilizan bolsas de plástico, tubos flexibles o cajas de plástico duro con orificios de perforación adecuada para el crecimiento del hongo. Los granos de cereales o leguminosas son secados superficialmente e inoculados con una solución de esporas y posteriormente empacados.

## **2. Efecto de la FES sobre la composición química de leguminosas**

En el **Cuadro 8** se presentan los cambios en la composición química de leguminosas como el frijol y el garbanzo bioprocesados por FES y cambios en la composición nutricional (Aminoácidos esenciales, Digestibilidad *in-vitro* e *in-vivo*).

**Cuadro 8.** Efecto de la fermentación en estado sólido sobre la composición química y valor nutrimental de leguminosas

	<b>Frijol</b>		<b>Garbanzo</b>	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
Composición química				
<b>Proteína (% bs)</b>	22.76	29.98	19.7	25.7
<b>Lípidos (% bs)</b>	2.53	1.51	6.1	2.6
<b>Almidón resistente (g/100g, bs)</b>	2.40	5.57	1.9	7.6
Nutricional				
<b>Aminoácidos esenciales</b>				
<b>Histidina</b>	2.41	2.59	2.43	2.54
<b>Isoleucina</b>	3.08	3.32	3.19	3.56
<b>Leucina</b>	7.20	7.19	7.14	7.22
<b>Lisina</b>	6.50	6.30	6.39	6.09
<b>Metionina + Cisteína</b>	2.14	2.55	2.18	2.59
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	8.50	9.19	8.80	9.87
<b>Treonina</b>	3.50	3.75	3.46	3.85
<b>Triptófano</b>	1.36	1.29	1.10	1.06
<b>Valina</b>	3.51	3.70	3.54	3.76
<b>Total</b>	38.2	39.88	38.23	40.5
<b>Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)</b>	72.2	83.2	69.25	75.14
<b>Digestibilidad <i>in vivo</i> (%)</b>				
<b>Aparente</b>	81.10	86.20	-	-
<b>Verdadera</b>	83.70	88.80	-	-

Adaptado de (Angulo-Bejarano y col 2008)

### **a. Proteínas**

Reyes Moreno y col (2000) reportaron que la FES de los garbanzos causo un aumento significativo del contenido de proteína cruda (13-14%) respecto a los no fermentados. Esos valores pueden deberse a la síntesis de proteína causada por la proliferación de *Rhizopus stolonifer*, así como la síntesis de enzimas por el propio hongo y a la reducción de las concentraciones de otros constituyentes. De igual manera Paredes-López y Harry (1989) reportaron un aumento significativo en la cantidad de proteínas después de una fermentación de 72 horas con *Rhizopus oligosporus*.

Randhir y Shetty (2007) reportaron un incremento lineal de proteína con respecto al crecimiento del inóculo. El contenido de proteína incremento de 18% durante el comienzo la fase de crecimiento a 34% al día 10 y mantuvo niveles similares en el resto de la fase de crecimiento.

### **b. Lípidos**

Sparringa y owens (1999) reportaron una disminución continua de la materia seca durante la fermentación de 980 k/kg de peso inicial en cotiledones secos a 28 horas, 835 g a 72 horas, el decremento de materia seca fue atribuido a la reducción de lípidos, estos se redujeron 135 g/kg en muestra seca a 72 horas, representando el 80% del total de materia seca perdida. Reyes Bastidas y col (2010) analizaron las propiedades nutricionales de harinas de Tempe de frijol común, en cuanto al contenido de lípidos ellos encontraron una reducción del 38.4%. Esta disminución se le atribuye al hecho de que *R. oligosporus* produce lipasas que liberan ácidos grasos,

los cuales son oxidados y usados como fuente de energía del hongo (Reyes-Bastidas y col 2010).

#### **c. Carbohidratos**

Reyes-Bastidas y col (2010) reportaron una disminución del 3.5 % de carbohidratos en el frijol bioprocesado por FES con respecto al frijol crudo.

#### **d. Fibra dietaria**

Guzmán-Uriarte y col (2013) analizaron la composición química de frijol común bioprocesado por FES, reportando un incremento en fibra soluble, insoluble y fibra total, 4.74% a 13.32%, de 11.30% a 22.51% y de 28.92% a 39.17%, respectivamente. La presencia de fibra dietaria brinda importantes efectos a la salud debido a que han sido considerados ingredientes funcionales por reducir el riesgo de cáncer de colon (Bingham y col 2003). Los cambios observados en la fibra pueden ser debidos a la lixiviación de algunos compuestos durante las etapas previas de la fermentación (cocción), además el crecimiento del hongo el cual consumirá como fuente principal ácidos grasos y posteriormente carbohidratos y grasas como fuentes de energías desarrollando micelios ricos en fibra (Rochín-Medina y col 2015).

#### **e. Almidón resistente**

Sánchez-Magaña y col (2014) analizaron el efecto de la FES en frijol sobre contenido de almidón resistente, reportaron un incremento de almidón resistente después de la fermentación. De igual forma, Angulo- Bejarano y col (2008) evaluaron el efecto de la FES en garbanzo encontrando un comportamiento similar al

incrementar el contenido de AR de 19 a 76 g/kg en garbanzo crudo y fermentado respectivamente. El efecto de las etapas previas al proceso como remojo, cocción y el efecto de la temperatura permiten la formación de enlaces de hidrogeno entre las cadenas moleculares dentro del granulo de almidón.

#### **f. Vitaminas y minerales**

En un estudio realizado por Steinkraus y col (1961) se encontró que en el proceso de la elaboración de tempe, la riboflavina se duplica, la niacina se incrementa siete veces y la actividad de la cobalamina aumenta 33 veces. Por otro lado, la tiamina disminuye por el efecto térmico del tratamiento y el tiempo de fermentación. Kao y Robinson (1978) también reportaron que las vitaminas solubles, con excepción de la tiamina, sufren un incremento en tempe elaborado a partir de garbanzo.

### **3. Efecto de la FES sobre e valor nutricional de leguminosas**

#### **a. Digestibilidad proteínica**

Díaz-Camacho (2010) concluyó que el Tempe brinda alta calidad y digestibilidad a las proteínas, como consecuencia de la producción de proteasas por el *hongo Rhizopus oligosporus*, que fragmentan a las proteicas de las leguminosas en aminoácidos. Proporcionando así proteínas hidrolizadas que son absorbidas con mayor facilidad. Reyes-Moreno y col (2000) reportaron digestibilidad in vitro con valor de 78.89- 80.5%, estos valores son mayores a la harina de frijol crudo 68.61-73.08%.

## **b. Contenido de aminoácidos esenciales**

Rochin-Medina y col (2015) optimizaron el proceso de fermentación en frijol negro para obtener mejor capacidad antioxidante y nutracéutica, con respecto al contenido de aminoácidos esenciales, estos mejoraron por el proceso de fermentación; el contenido de Histidina, Isoleucina, los aminoácidos azufrados (Metionina + Cisteína), los aromáticos (fenilalanina + Tirosina), treonina y valina incrementaron de manera significativa.

## **c. Valor biológico de la proteína**

El valor nutricional de los distintos tipos de proteínas difiere según sea su composición de aminoácidos, relación de aminoácidos esenciales, susceptibilidad a hidrólisis durante la digestión, fuente y efectos de procesamiento (Friedman 1996). Reyes-Moreno y col (2000) al optimizar las condiciones de proceso de FES en garbanzo observaron un incremento en digestibilidad proteínica in vivo, PER, NPR, C-PER y PDCAAS bajo las condiciones óptimas de 34.9°C y 51 h de fermentación. Reyes-Bastidas (2008) observó un incremento en el C-PER de tempe de garbanzo en relación a la harina de garbanzo integral, así como un incremento en la calificación química tras el proceso de fermentación. Los resultados de Angulo-Bejarano y col (2008) concuerdan con lo anteriormente descrito, obteniendo valores de PER, C-PER, NPR y PDCAAS mayores para garbanzo fermentado en comparación a los del grano sin tratar.

#### 4. Efecto de la FES sobre el contenido de fitoquímicos en leguminosas

En el **Cuadro 9** se muestra el efecto que tiene la FES en el perfil de fitoquímicos.

##### a. Compuestos fenólicos totales

Randhir y Shetty (2007) reportaron que la hidrólisis enzimática en la FES de fenólicos conjugados resultó en un mejoramiento del contenido de fenólicos libres con lo que eleva la funcionalidad relevante en la salud. Los cambios en el contenido de fenólicos se atribuyen a la movilización de *R. oligosporus* en el sustrato.

La cantidad inicial de sustrato comenzó con un bajo contenido en fenólicos 4 mg/g base húmeda, esta cantidad se duplicó para el día 8 cuando el incremento de la actividad de  $\beta$ - glucosidasa fue detectado, la cual incremento a 10 mg/g base humedad a los 18 días de incubación. Indicando la movilización de fenólicos por las enzimas del hongo. Ming-Yen y Cheng-Chun (2010) analizaron el contenido de flavonoides sobre granos de soya negra fermentada con *bacillus subtilis*, utilizaron diferentes solventes para la extracción, siendo la extracción con acetona la que mostro mayor contenido de flavonoides. Los extractos de flavonoides fueron mayores en la soya fermentada al compararla con la soya cruda.

Este incremento es resultado de la producción de  $\beta$ - glucosidasa. Esta enzima cataliza la liberación de fenólicos totales y flavonoides durante la fermentación permitiendo así el incremento de estos compuestos. Con respecto a los taninos, estos son localizados en las capas exteriores de los granos de legumbres, como

consecuencia de la manufactura de Tempe (descascarillado) los taninos son reducidos

**Cuadro 9.** Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los niveles de fitoquímicos en leguminosas

Compuesto bioactivo	Frijol crudo		Garbanzo	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
<b>Fenólicos totales (mg/100 g)</b>	192.3	431.33	221-269.38	836
<b>Fenólicos libres (mg/100 g)</b>	35.91	190.47	93	631
<b>Fenólicos ligados(mg/100 g)</b>	156.46	240.86	128	205
<b>Taninos</b>	-	-	4.63	1.24
<b>Inhibidores de tripsina</b>	-	-	10.96	1.12
<b>Ácido fítico</b>	6.84	2.85	7.98-10.8	1.1-2.30
<b>Tempe de soya</b>				
<b>Isoflavonas</b>	Cruda	Amarilla	Negra	
<b>Agliconas totales</b>		15.7	17.4	
<b>Daidzeína</b>		8.0	6.8	
<b>Gliciteína</b>		0.5	0.7	
<b>Genisteína</b>	460-1820	7.2	9.9	

Adaptado por Sánchez-Magaña (2014).

antes del paso de fermentación. Paredes López y Harry (1989) reportaron la pérdida del 100% de taninos en frijol de soya durante la preparación del Tempe como resultado de los tratamientos aplicados durante la producción de sustrato. El descascarillado y la cocción eliminaron más del 90% de los taninos por la predominancia de su localización. (Paredes-López y Harry 1989).

## **5. Efecto de la FES sobre las propiedades nutraceuticas de leguminosas**

### **a. Actividad antioxidante**

La FES podría incrementar el contenido de fenólicos y la actividad antioxidante de semillas y legumbres con lo que se incrementaría el potencial benéfico en la salud. Vargas y col analizaron el potencial nutraceutico de harinas precocidas de maíz y de frijol, reportando que la harina de Tempe tuvo mejores características al presentar un contenido alto de fenólicos totales, DPPH y de ORAC de 23.3 mg EC/g, 62.3% y 87.9  $\mu$ ml TE/g respectivamente, en comparación con la muestra de maíz extrudido. Reyes-Bastidas (2014) reportó un incremento de la actividad antioxidante de la harina de frijol común fermentada, de 19.85% de la harina sin fermentar a 37.83 % de la harina fermentada; este valor es cercano a los obtenidos por frijoles oscuros, por lo que los investigadores concluyen que la fermentación representa una

alternativa para añadir potencial nutracéutico a frijoles claros como lo es el azufrado higuera, altamente consumible en el noroeste de México.

#### **b. Actividad antimutagénica**

Reyes- Moreno y col (2014) reportaron actividad antimutagénica en bebidas preparadas con maíz extrudido y frijol fermentado, la mezcla mostro valores de inhibición de mutagenicidad: 48.37% (100 µg/tubo), 77.06% (500 µg/tubo) y 77.63% (1000 µg/tubo); indicando que a concentraciones máximas, la mezcla puede considerarse como un antimutágeno fuerte.

#### **c. Actividad anticancerígena**

Los compuestos fenólicos se consideran posibles agentes para combatir cáncer los cuales se ven incrementados en leguminosas mediante el proceso de FES (McCUE y col 2004). El almidón resistente tiene efectos benéficos sobre distintos tipos de cáncer (Cardador-Martinez y col 2006). En garbanzo, este tipo de almidón se vio incrementado tras la cocción, previa a la fermentación (Sánchez-Magaña y col 2014), debido a la retrogradación de la amilosa durante el procesamiento térmico, lo que podría aumentar sus efectos benéficos sobre el cáncer.

#### **d. Actividad antihipertensiva**

Para valorar la capacidad antihipertensiva se calcula el IC<sub>50</sub>, que se define como la concentración requerida para inhibir el 50% de la actividad de la ECA, entre menor sea el valor, significa que el inhibidor tiene mayor potencial hipertensivo. Guzmán-Uriarte y col (2013) analizaron el potencial antioxidante e hipertensivo de frijol común

bioprocesado por FES, en cuanto a la actividad hipertensiva encontraron valores de  $IC_{50}$  0.0117 vs 79.22  $\mu\text{g/mL}$  para la harina de frijol bioprocesada y la harina de frijol común sin bioprocesamiento, respectivamente. Durante el bioprocesamiento por FES existe liberación de sustancias bioactivas como fitoquímicos capaces de inhibir ECA.

#### **e. Actividad hipoglucemiante (antidiabética)**

Los inhibidores naturales  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa provenientes de alimentos vegetales son una excelente alternativa para el control de la hiperglicemia postprandial, brindando beneficios sin los efectos negativos de los fármacos utilizados con este fin. El grado alimenticio de los inhibidores  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos garbanzo bioprocesado por FES (añadido con sus cascaras), son potencialmente seguros, y es por esto que son una alternativa para la modulación de la digestión de carbohidratos y control para el índice glicémico de productos alimenticios. La FES puede ser una estrategia eficiente para mejorar el contenido fenólico, actividad antioxidante y contenido de enzimas inhibidoras asociadas con diabetes (Sánchez-Magaña y col 2014).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El frijol común es una fuente importante de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides) con alta actividad antioxidante e hipoglucemiante, los cuales incrementan significativamente durante la fermentación en estado sólido con diferentes microorganismos. Sin embargo, no existen reportes acerca del efecto de la fermentación en estado sólido con el hongo *Rhizopus oligosporus* sobre los perfiles y niveles de compuestos fenólicos con actividad antioxidante e hipoglucemiante en frijol común. Este estudio es necesario para definir el posible beneficio antioxidante y el potencial hipoglucemiante de esta leguminosa fermentada.

## **V. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios ocasionados por el bioproceso de fermentación en estado sólido con el hongo *Rhizopus oligosporus* en los perfiles y niveles de compuestos fenólicos, así como, en actividad antioxidante y potencial hipoglucemiante de frijol común cv Azufrado Higuera y Negro Jamapa.

### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Estudiar el efecto de las etapas del proceso de fermentación en estado sólido (FES) sobre el contenido de compuestos fenólicos hidrófilicos totales de frijol común.
2. Identificar y cuantificar compuestos fenólicos hidrófilicos individuales en harinas de frijol común sin procesar y de cada una de las etapas del bioproceso de FES.
3. Analizar el efecto de las etapas del proceso de FES sobre la actividad antioxidante (ABTS, DPPH, ORAC) de extractos de fitoquímicos hidrófilicos de frijol común.
4. Determinar el efecto de las etapas del proceso de FES sobre el potencial hipoglucemiante de extractos de fitoquímicos hidrófilicos de frijol común.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **A. MATERIALES**

Se utilizaron dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), variedad azufrado higuera y variedad negro Jamapa como material de estudio. Una vez adquirido el material se limpió y almacenó en recipientes de plástico, cerrados herméticamente, a 8-10 °C hasta su uso. Para llevar a cabo la fermentación se utilizó el microorganismo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

### **B. METODOS**

#### **1. Características físicas del grano de frijol común (*P. vulgaris*)**

##### **a. Dimensiones**

La determinación se realizó a 25 granos seleccionados al azar, utilizando un vernier. La medición se hizo por triplicado.

##### **b. Peso de 100/1000**

Se determinó el peso de 100/1000 granos seleccionados al azar en una balanza OHAUS (Mod TP2KS, Seedburo Equipment, Co., EUA). La determinación se realizó por triplicado.

### **c. Peso hectolítrico**

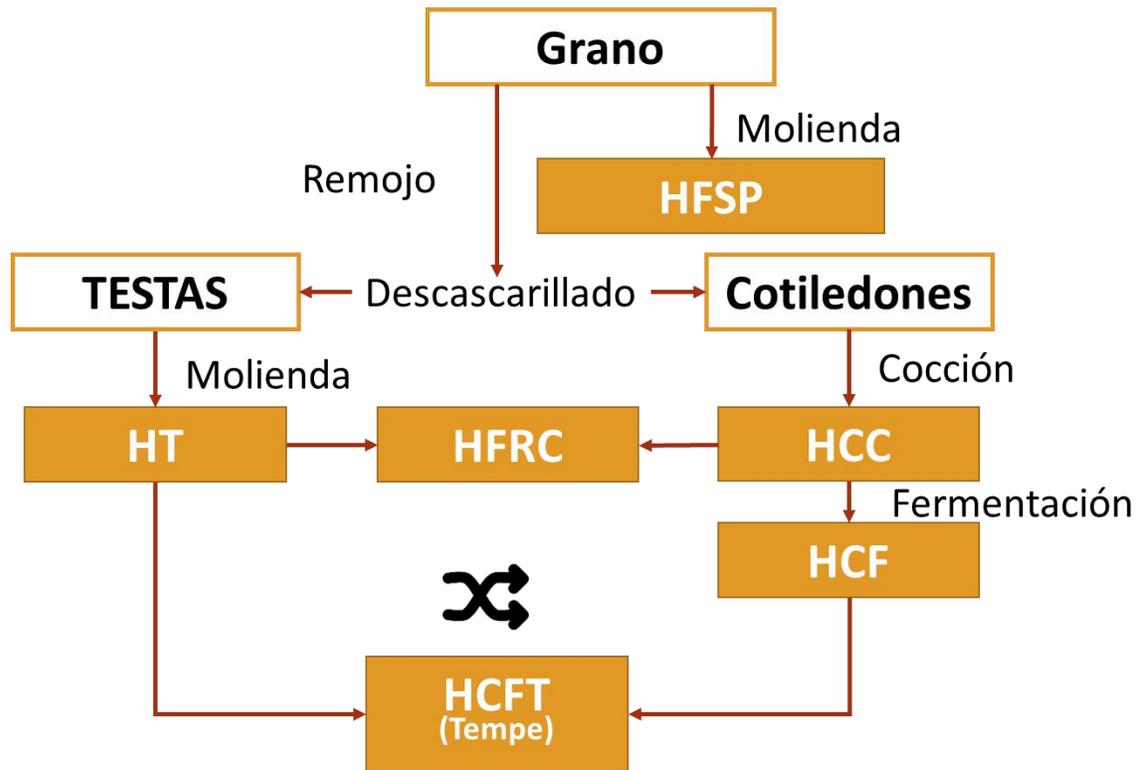
Se determinó utilizando un recipiente de acero inoxidable de 1 L de capacidad, los resultados obtenidos se reportaron como kg/hL. Se reportó el promedio de diez repeticiones.

### **d. Calibre**

Se medirá contando el número de granos en 30 g de muestra. Se utilizó una balanza OHAUS (mod TP2KS, Seedburo Equipment, Co., EUA). Se reportó el promedio de cinco repeticiones.

## **2. Obtención de las harinas de frijol común**

Los granos enteros de frijol común fueron sometidos a molienda para la obtención de la harina de frijol sin procesar (**HFSP**=harina de frijol sin procesar). Para obtener harina de testa (**HT**) y cotiledón cocido (**HCC**), los granos enteros se remojaron 4 horas en agua destilada; relación 1:3 (p/v). Posterior al tiempo de remojo las testas fueron removidas manualmente, se secaron y molieron para pasar a través de una malla 80, se empaquetaron y almacenaron a (4°C). Los cotiledones fueron sometidos a cocción ácida durante 90°C por 30 min, con relación 1:3 (p/v). Se drenaron y secaron superficialmente a temperatura ambiente y molieron, se empaquetaron y almacenaron a (4 °C) (**Figura 6**). Las harinas de testa y cotiledón cocido fueron mezcladas para obtener **HFRC** (**HFRC**= Harina de frijol remojo-cocción). Para la obtención de las harinas de cotiledón fermentado (**HCF**) se utilizó el procedimiento de Guzmán-Uriarte y col (2013) y Sánchez-Magaña y col (2014) con modificaciones.



**Figura 6.** Diagrama de flujo para la obtención de harinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* cv. Azufrado higuera y negro Jamapa).

### **a. Preparación del sustrato**

Se pesaron 200 gr de cada muestra, los granos enteros se remojaron por 4 h en agua destilada; relación 1:3 (p/v). Posterior al tiempo de remojo las testas fueron removidas manualmente, se secaron y molieron para pasar a través de una malla 80, se empaquetaron y almacenaron a (4°C). El remojo y descascarillado son pasos que sirven para acondicionar el grano, con el fin de permitir la acción del hongo, la penetración de la enzima y el crecimiento del micelio adecuado. Los cotiledones fueron sometidos a cocción ácida durante 90°C por 30 min, con relación 1:3 (p/v). Se drenaron y secaron superficialmente a temperatura ambiente.

### **b. Inoculo**

Para la fermentación se utilizó la cepa *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. La cepa liofilizada se propagó en agar de papa dextrosa, en tubos inclinados a 35°C hasta que el cultivo alcanzó la esporulación adecuada. Los cultivos se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso. Las esporas se cosecharon con agua destilada estéril y la concentración de la solución obtenida se ajustó para obtener la concentración de esporas requeridas ( $1 \times 10^6$ /mL) empleando el método de Mc Farland (Leptospira LABORATORY 1997).

#### **a) Fermentación**

Para realizar la fermentación, se añadió suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) a los cotiledones en una relación de 3 mL por cada 100 g de sustrato.

La muestra, una vez inoculada, se colocó en bolsas de polietileno de 15 x 25 cm con perforaciones hechas a 4 cm de distancia. Las condiciones de FES se obtuvieron siguiendo la metodología de León-Murillo (2016), temperatura de fermentación= 33.5 °C / tiempo de fermentación= 108 h. El frijol bioprocesado se secó (50 °C/ 8 h), se enfrió a 25° C y posteriormente se molió y almacenó para la obtención de harina de cotiledón fermentado. Para obtener la harina de tempe se repitió el mismo proceso y los cotiledones fermentados, se mezclaron con sus correspondientes testas molturadas, se empacaron y mantuvieron a 4° C en recipientes correctamente cerrados.

### **3. Obtención de los extractos de fitoquímicos libres**

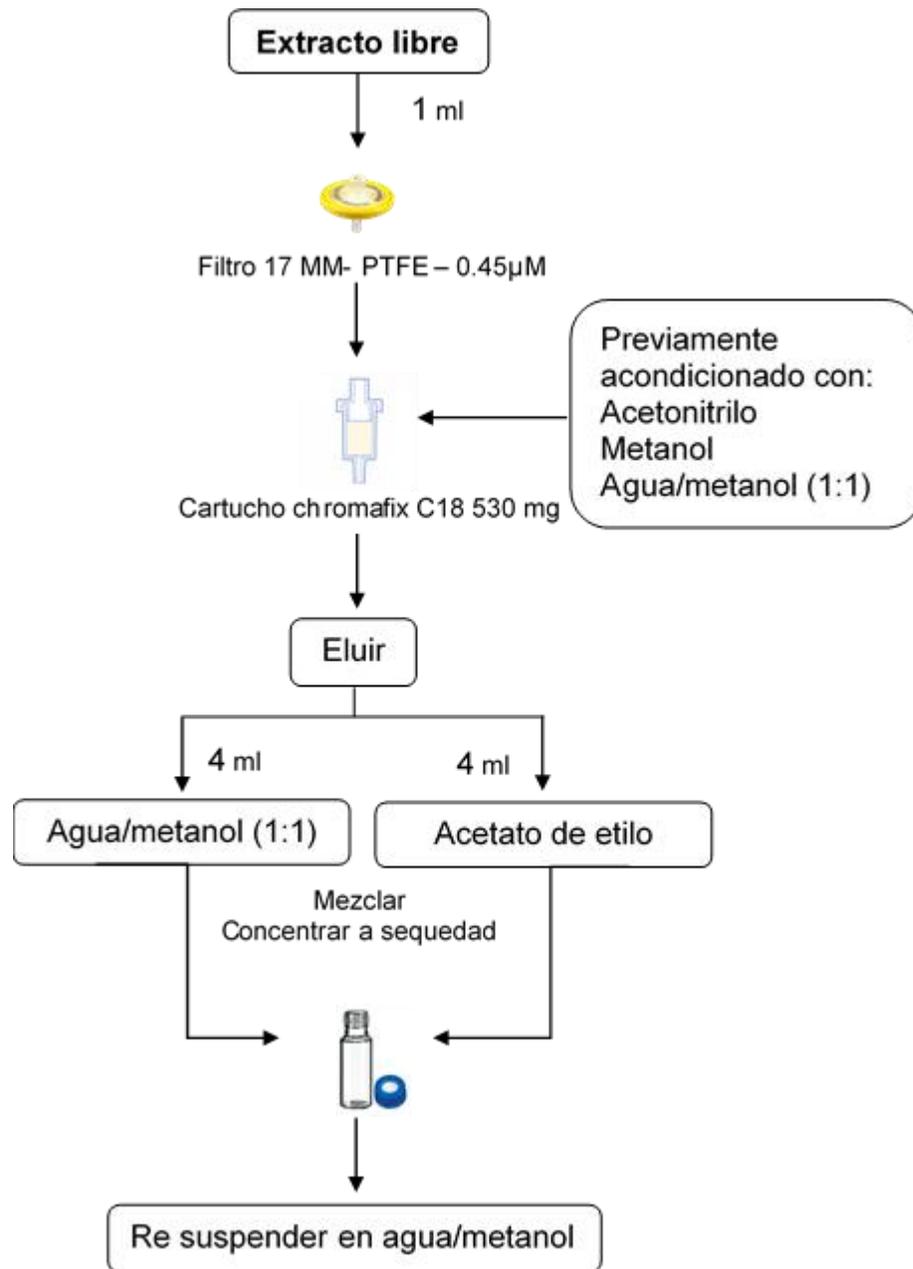
La extracción de fitoquímicos se realizó en las harinas obtenidas durante diferentes etapas del proceso de fermentación en estado sólido de frijol común, **HFSP**, **HT**, **HCC**, **HFRC** y **HCF**. Para la obtención de los extractos libres se siguió el procedimiento descrito por Adom y Liu (2002). Los fitoquímicos libres se extrajeron de 0.5 g de muestra con 10 mL de etanol al 80% (v/v), se agitaron en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) a velocidad 25 por 10 min, se centrifugaron a 5000 x g/10°C durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un tubo cónico a 45°C a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation) hasta un volumen de 2mL, se secaron y almacenaron a 4°C. Estos extractos se utilizaron para analizar compuestos fenólicos, identificación de compuestos fenólicos, actividad antioxidante (ABTS, DPPH, ORAC) e inhibición de enzimas ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa).

#### 4. Determinación de compuestos fenólicos totales

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos (libres) se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col (1999). En viales de 2 mL, se agregaron 20  $\mu$ L de una solución estándar de ácido gálico para construir una curva de calibración y 20  $\mu$ L de muestra (por cuadruplicado), y se utilizó agua destilada y posteriormente se les agregó 100  $\mu$ L de Folin-Ciocalteu, se anexaron 300  $\mu$ L de NaCO<sub>3</sub> al 7% y se dejó reposar durante 8 minutos. Una vez transcurridos los 8 minutos, se agregaron 380  $\mu$ L de agua destilada hasta a completar 2 mL. Obtenidos los 2 mL se dejó reposar 90 minutos en oscuridad. Transcurridos los 90 minutos se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro (UV-vis Genesys 10 UV Thermo Electron Corporation, Madison, WI, EE.UU) a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / 100 g de muestra, bs.

#### 5. Identificación de compuestos fenólicos

Para determinar el perfil de compuestos fenólicos se analizaron 10  $\mu$ L del extracto etanólico (previamente purificado, **Figura 7**) con un equipo de UPLC-DAD ACCELA (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA) acoplado a un detector de masas LTQ-DO utilizando una fuente de ionización por electrospray. La separación se realizó en una columna FORTIS C18 (50 x 2.1 mm) (Fortis Technologies LTD., Cheshire, Inglaterra). La fase móvil consistió de agua-ácido fórmico al 1 % (A) y acetonitrilo (B)



**Figura 7.** Proceso de limpieza de extractos libres de frijol común *P. vulgaris* L.

inyectándose al HPLC con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. El tiempo total de corrida fue de 50 minutos. La detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. La identificación de compuestos fenólicos en la muestra se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros de los picos cromatográficos con los de estándares comerciales y por espectrometría de masas.

## **6. Evaluación de Actividad Antioxidante**

### **a. ABTS**

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Re y col (1999). La AAox se determinó a los extractos de compuestos fenólicos libres por el método del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) para compuestos hidrofílicos; procedimiento basado en la captación por los antioxidantes del radical catión  $ABTS^{\cdot+}$  generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con una longitud de onda de 734 nm. En este método los antioxidantes se añaden una vez el  $ABTS^{\cdot+}$  se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir de la decoloración de este. El radical  $ABTS^{\cdot+}$  se obtuvo tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después la solución de  $ABTS^{\cdot+}$  se diluyó con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de  $ABTS^{\cdot+}$ . La reacción entre la solución de trabajo de  $ABTS^{\cdot+}$  y muestras con diferentes concentraciones se iniciaron y almacenaron (25°C) hasta que la reacción fue completada. La disminución de

coloración se monitoreo en un Lector de Microplacas a 734 nm y se expresó como porcentaje de inhibición de ABTS, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox. Los datos se expresan como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

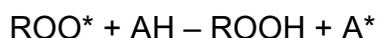
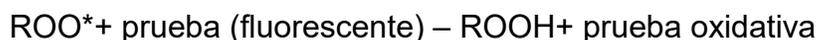
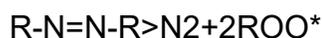
#### **b. DPPH**

Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determinó el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución etanólica de DPPH mediante el método de Brand- Williams (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución madre de DPPH aproximadamente 20 mg/L del radical en metanol, 990  $\mu\text{L}$  de esta solución se mezclaron con 10  $\mu\text{L}$  de solución de extracto a diferentes concentraciones. Se preparó un blanco de muestra con 990  $\mu\text{L}$  de etanol y 10  $\mu\text{L}$  de muestra y un blanco de referencia con 990  $\mu\text{L}$  de DPPH y 10  $\mu\text{L}$  de solvente. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox /100g muestra, bs.

#### **c. ORAC**

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el método de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC), desarrollado para compuestos hidrofílicos (Ou y col 2001; Prior y col 2005). La degradación térmica del compuesto 2-2'-Azobis-aminopropano (AAPH) produce radicales peroxilo (ROO), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente diclorofluorescina (DCF). El

grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) atrapa los radicales libres. Se preparó la solución generadora de radicales libres (2-2'-Azobis-aminopropano) AAPH agregando 0.207 g del reactivo y se afora en un matraz de 5mL. La fluoresceína se preparó a una concentración de 0.1  $\mu$ M, a 25  $\mu$ L de muestra se le agregó 150  $\mu$ L de fluoresceína y se mezcló agitando a 1200 rpm por 20 seg la reacción inicia al agregar 25  $\mu$ L de AAPH. La fluorescencia se mide a 485 nm de excitación y 583 nm de emisión. La reacción de los radicales peroxilo genera la perdida de fluorescencia con el tiempo como se indica en la siguiente reacción:



El efecto de un antioxidante es integrado por el área neta bajo la curva sobre la perdida de la fluorescencia (AUC) (AUCAOX – AUCno AOX). Los resultados se expresaron como micromoles ( $\mu$ mol) Trolox (TE) por 100 g de base seca ( $\mu$ mol de TE/100g, bs).

## **7. Actividad hipoglucemiante**

### **a. Inhibición de $\alpha$ -amilasa**

Se usó colorimetría del ácido 3,5-dinitrosalicílico (McCue y col 2005). Se preparó una solución de  $\alpha$ -amilasas a una concentración de 2U/mL en buffer de fosfatos de

potasio pH 6.9 al 0.2 mM con 6.7 mM de NaCl. La cantidad de 50 $\mu$ L de muestra se mezcló con 50  $\mu$ L de enzima y se incubó a 37°C por 10 min, luego se le agregó 83 $\mu$ L de solución de almidón al 1% en buffer de fosfatos de potasio pH 6.9 al 0.2 mM con 6.7mM de NaCl. Luego de 5 min de incubación a 37°C se detiene la reacción con 165  $\mu$ L de ácido dinitrosalicílico en baño de agua hirviendo por 10 min, se enfría y diluye a 1656 mL con agua. Se midió a una absorbancia a 540 nm. Los datos se reportan como porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa (%IAA). Se utilizó una curva de acarbosa como control y los resultados se expresan como  $\mu$ g equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

#### **b. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa**

La inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa se midió según la metodología de López- Angulo y col (2014) con ligeras modificaciones. En una microplaca de 96 pocillos, se agregaron (50  $\mu$ L) de las alícuotas de las muestras y mezclaron con 10  $\mu$ L de la  $\alpha$ -glucosidasa (0.5 U/mL) en buffer de fosfato (0.1 M, pH 6.9); la microplaca se incubó durante 10 min a 37°C y se añadieron 50  $\mu$ L de *p*-nitrofenilo-glucopiranosido en buffer de fosfato (5mM) a cada pocillo. Nuevamente, la microplaca se incubó (37°C / 10 min) y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un Lector de Microplacas (Synergy™ , BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Los datos se reportaron como porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (%IAG). Se utilizó una curva de acarbosa como control y se reportaron resultados como  $\mu$ g equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

## **8. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) factorial, seguido por comparación de medias aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 5%.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### A. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL GRANO DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L)

Las características físicas del grano se muestran en el **Cuadro 10**. Estas características son de gran importancia debido a que brindan importante atractivo visual para la comercialización y las formas de consumo de este grano. El frijol común azufrado higuera obtuvo valores promedio en sus dimensiones de 13.35 mm, 7.65 mm y 6.50 mm para largo, ancho y grosor, respectivamente. Las medidas de frijol negro jamapa fueron 9.92 mm, 6.41 mm y 4.23 para largo, ancho y grosor respectivamente. El tamaño de semilla está asociado con la domesticación del grano de frijol y lo distingue de muchos tipos de frijol para el consumo humano (Schmutz y col 2014). Con respecto al peso de 100 granos los valores fueron de 49.1 g y 21.03 g, para azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente. Siendo las primeras clasificadas de tamaño grande (>40 g/ 100 semillas) y las segundas de tamaño pequeño (hasta 25 g/ 100 semillas).

El peso hectolítrico fue de 83.35 kg/hL y 80.39kg/hL para azufrado higuera y negro jamapa, respectivamente. Este parámetro es el mejor conocido por los productores, se define como el peso en kilogramos de un volumen de grano de 100 litros. Este valor estima la calidad física del grano. Por último el % de testa para el frijol azufrado higuera fue de 7.16% y negro Jamapa con 10.17%, resultados que concuerdan con Iniestra-González y col (2005) con valores de % testa de 7.7 – 8.6 para frijoles azufrados y de 10.2 – 11.9 para frijoles negros. Este parámetro se relaciona con el

**Cuadro 10.** Características físicas de los granos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*

L)

Característica física	Frijol común	
	Azufrado Higuera	Negro Jamapa
<b>Dimensiones (mm)</b>		
<b>Largo</b>	13.35 ± 1.33	9.92 ± 0.79
<b>Ancho</b>	7.65 ± 0.39	6.41 ± 0.56
<b>Grosor</b>	6.50 ± 0.47	4.23 ± 0.36
<b>Peso de 100 granos (g)</b>	49.1 ± 0.6	21.03 ± 0.55
<b>Peso hectolítrico (kg/hL)</b>	83.35 ± 0.73	80.39 ± 0.52
<b>%Testa</b>	7.16 ± 0.43	10.17 ± 0.12

color de la testa, siendo los de mayor % testa los granos de colores oscuros (Pérez-Herrera y col 2002). Otros autores han indicado que este parámetro es determinante en el tiempo de cocción del frijol y otras leguminosas sin embargo Pérez-Herrera y col (2002) encontraron una correlación baja ( $r= 0.28$ ) entre % testa y tiempo de cocción, reportando que esto depende en gran medida a las diferencias en la capacidad de imbibición de las variedades de frijol y no de otros componentes estructurales del grano. Gómez-Favela y col (2017) reportan que en variedades de garbanzo con % mayor testa necesitaron más tiempo para alcanzar la saturación de agua comparado con granos de cascara delgada

## **B. EFECTO DEL PROCESO DE FES SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS HIDRÓFILICOS TOTALES DE FRIJOL COMÚN**

### **1. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre el contenido de fenólicos hidrofílicos totales de harinas de frijol común**

El contenido de fenólicos totales (**CFT**) de la harina de frijol común (*P. vulgaris*) sin procesar (**HFSP**=harina de frijol sin procesar), harina de frijol obtenido después de las etapas de remojo y cocción (**HFRC**=harina de frijol remojado-cocido), harina de cotiledón cocido (**HCC**) y harina de testas (**HT**) de las variedades azufrado higuera y negro jamapa se muestra en el **Cuadro 11**.

El **CFT** de **HFRC** fue significativamente ( $p<0.05$ ) menor que en **HFSP** en ambas variedades de frijol, lo cual significa que las etapas previas (remojo-cocción) a la **FES**

**Cuadro 11.** Contenido de fenólicos totales (**CFT**) en harinas de frijol común sin procesar y remojado cocido.

<b>Frijol</b>	<b>Muestra</b>	<b>CFT *</b>
<b>Azufrado Higuera</b>	<b>HFSP</b> <sup>1</sup>	70.20 ± 2.90 <sup>b</sup>
	<b>HFRC</b> <sup>2</sup>	59.75 ± 3.45 <sup>c</sup>
	HCC <sup>3</sup>	44.09 ± 3.32 <sup>d</sup>
	HT <sup>4</sup>	15.66 ± 0.17 <sup>f</sup>
<b>Negro Jamapa</b>	<b>HFSP</b> <sup>1</sup>	75.76 ± 5.32 <sup>a</sup>
	<b>HFRC</b> <sup>2</sup>	69.72 ± 0.73 <sup>b</sup>
	HCC <sup>3</sup>	36.68 ± 0.62 <sup>e</sup>
	HT <sup>4</sup>	33.03 ± 0.37 <sup>g</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ );  
<sup>1</sup> Harina de frijol sin procesar <sup>2</sup> Harina de frijol remojado-cocido <sup>3</sup> Harina de cotiledón cocido <sup>4</sup> Harina de testa; \*mg EAG/100g de HFSP o HFRC (bs)

disminuyeron el contenido de **CFT** en un 14.89% en la variedad azufrado higuera y un 7.97% en la variedad negro jamapa. En ambas variedades el **CFT** presente en **HCC** representó una mayor proporción (73.79%) en **HFRC** que **HT** (26.21%), a pesar de que la **HT** presentó una mayor concentración de **CFT** (218.7 – 324.0 mg EAG/100g de **HT**) que **HCC** (40.8 – 45.4 mg EAG/100g de **HCC**). Esto se debe a que **HCC** representa una mayor proporción (92.84%) en **HFRC** que **HT** (7.16%) en el grano.

Durante la preparación de tempe los granos se descascarillan (separación de la testa de los cotiledones) en una etapa previa a la **FES**, remojándolos regularmente en una disolución de ácido acético. Remojar en agua acidificada facilita en gran medida el descascarillado y garantiza una hidratación completa incluso de los granos más duros. Sin embargo, en la presente investigación el remojo fue realizado en agua sin acidificar, para evitar pérdidas importantes durante esta etapa de proantocianidinas, y antocianinas presentes principalmente en el frijol de la variedad negro jamapa, ya que estos compuestos son altamente solubles en agua acidificada.

El propósito de descascarillar los granos es solo para fermentar los cotiledones, los cuales son un sustrato más accesible para el desarrollo y crecimiento del hongo (facilita el acceso del hongo a los nutrientes del sustrato); es importante decir que el hongo no puede crecer en el grano entero. Diversos autores han reportado que en esta etapa de remojo existe una pérdida importante de compuestos fenólicos. En el proceso de remojo el agua entra al grano por absorción molecular, absorción capilar e hidratación, brindando un incremento de volumen en el grano. La reducción de

compuestos fenólicos puede ser atribuida a la lixiviación de fenólicos en el medio de remojo (Xu y Chang 2008).

La etapa de cocción es aplicada a los cotiledones con el fin de eliminar bacterias que puedan interferir con la fermentación, destruir factores antinutricionales y liberar los nutrientes requeridos para el crecimiento del hongo. El agua de cocción es retirada y los cotiledones son extendidos sobre una base con perforaciones. Este último paso es indispensable para eliminar el exceso de agua pues esto provocaría el crecimiento de bacterias, deterioro del tempe, y menor vida de anaquel. Muchas veces, esta etapa de cocción se realiza en agua acidificada, para favorecer el crecimiento posterior del hongo, ya que éste crece pH bajos, y además restringir el crecimiento de posibles bacterias de descomposición durante el proceso de **FES**. Sin embargo, durante la etapa de cocción de los cotiledones, también existen pérdidas importantes de compuestos fenólicos en el agua de cocción, la cual es retirada de los granos cocidos (Xu y Chang, 2008; 2011).

## **2. Efecto de la *FES* sobre el contenido de fenólicos hidrofílicos totales de harinas de frijol común**

En el **Cuadro 12** se presenta el contenido de compuestos fenólicos totales en harinas de cotiledón cocido de frijol común, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. Se puede observar que el cotiledón cocido de la variedad negro jamapa presentó un contenido significativamente mayor (79.08 mg EAG/100g de muestra, bs) de compuestos fenólicos totales que la variedad azufrado higuera (47.49 mg EAG/100g de muestra, bs). Estos valores concuerdan con los

**Cuadro 12.** Contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**) en harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por **FES**

<b>Frijol</b>	<b>Muestra</b>	<b>CFT*</b>
<b>Azufrado Higuera</b>	<b>HCC<sup>1</sup></b>	47.49 ± 3.58 <sup>d</sup>
	<b>HCF<sup>2</sup></b>	117.77 ± 0.05 <sup>b</sup>
<b>Negro Jamapa</b>	<b>HCC<sup>1</sup></b>	79.08 ± 0.55 <sup>c</sup>
	<b>HCF<sup>2</sup></b>	164.47 ± 1.75 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ );

<sup>1</sup> Harina de cotiledón cocido <sup>2</sup> Harina de cotiledón fermentado \*mg EAG/100g de muestra en base seca

reportados por diversos investigadores para frijol común (Guzmán Uriarte y col, 2013; Rochín-Medina y col, 2015; Nyau y col, 2016).

En el **Cuadro 12** también se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales en harina de cotiledón de frijol bioprocesado por **FES**. Al analizar el efecto del bioproceso de **FES** sobre el contenido de compuestos fenólicos nos damos cuenta que en ambas variedades de frijol, este bioproceso, de manera general causó aumento en el contenido de compuestos fenólicos totales (+148% en la variedad azufrado higuera y +108% en la variedad negro Jamapa).

Este incremento en el **CFT** ha sido reportado en nuestro equipo de trabajo por Guzmán Uriarte y col (2013) en frijol común azufrado higuera y Rochín Medina y col (2015) en frijol Negro Nayarit, ambos autores atribuyen el aumento producido por la FES a la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa que cataliza la liberación de agliconas del sustrato incrementando el **CFT**.

Otras investigaciones como la de Lee y col (2008) concuerdan con lo mencionado anteriormente, reportando que el **CFT** incrementa en frijol negro fermentado con diferentes hongos atribuyendo este incremento a la capacidad que tienen estos microorganismos de producir enzima  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, se ha reportado que distintas enzimas hidrolíticas producidas durante la FES están asociadas con la liberación de compuestos fenólicos (Robledo y col 2008; Cho y col 2009). Los resultados en el perfil de compuestos fenólicos obtenido después de la **FES** de los cotiledones de las variedades de frijol estudiadas en este trabajo, será descrito y discutido ampliamente en una sección posterior.

## C. EFECTO DEL PROCESO DE *FES* SOBRE EL PERFIL Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS HIDROFÍLICOS INDIVIDUALES IDENTIFICADOS EN FRIJOL COMÚN

### 1. Identificación de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales en frijol común variedades azufrado higuera y negro Jamapa

En el presente trabajo de investigación fueron identificados diferentes compuestos fenólicos de naturaleza no-flavonoide, como los ácidos hidroxicinámicos, y flavonoides, como flavonoles y flavanoles en las harinas obtenidas a partir de frijol azufrado higuera y negro Jamapa. En el **Cuadro 13** se presenta la longitud de onda de máxima absorción UV y los iones moleculares de los compuestos identificados por HPLC-DAD-MS; estos compuestos se muestran agrupados de acuerdo a la similitud en su estructura fenólica.

Los cromatogramas de *HCC* y *HCF* son presentadas en las **Figuras 8 y 9** para observar el efecto de la *FES* con el hongo *R. oligosporus* sobre el perfil de compuestos fenólicos en frijol común azufrado higuera y negro jamapa.

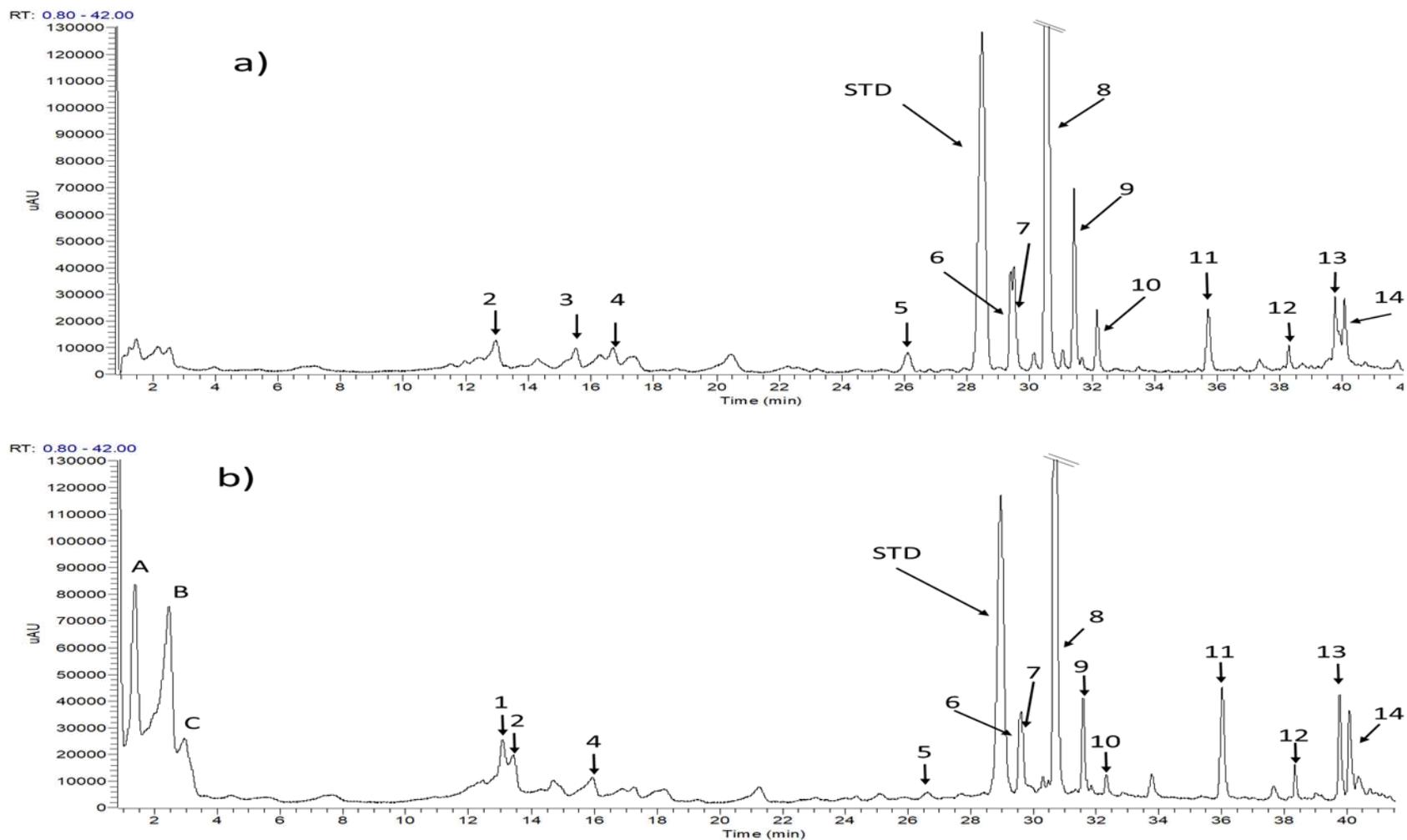
En la **Figura 8** se muestran los cromatogramas de *HCC* y *HCF* de frijol azufrado higuera, en los cuales se identificaron un total de 14 compuestos fenólicos. Los picos 1, 3 y 4 presentaron un espectro UV similar al del ácido ferúlico. En el análisis obtenido por HPLC-MS, estos picos presentaron un ion molecular negativo  $[M-H]^-$  de  $m/z$  385 correspondiente a un ácido aldárico (galactárico o glucárico) ligado a el

ácido ferúlico, y dos iones de fragmentación, [M-H]<sup>-</sup> de m/z 193 correspondiente a residuo de ácido

**Cuadro 13.** Identificación de compuestos fenólicos en extractos etanólicos de frijol común variedad azufrado higuera y

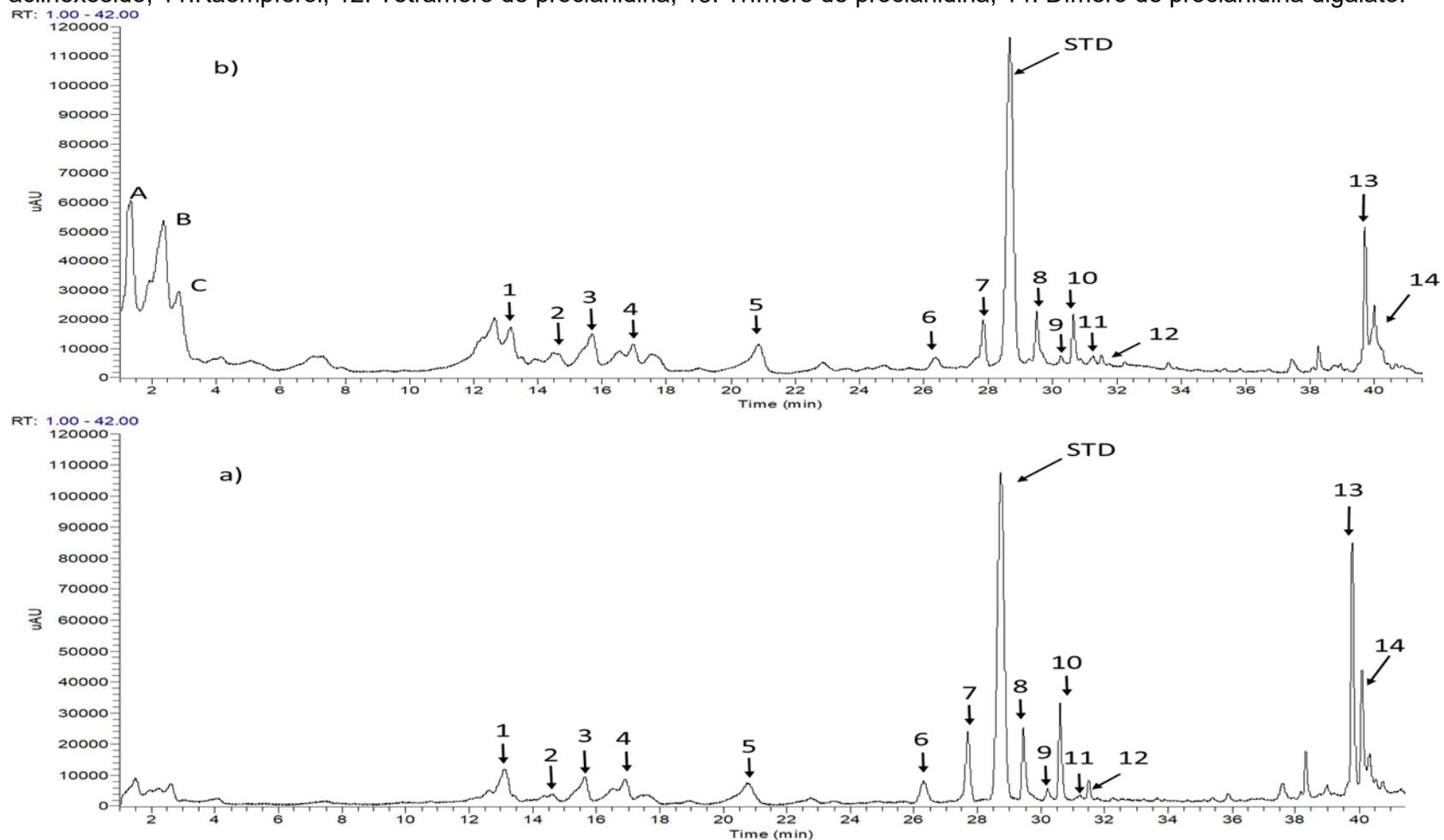
Identificación tentativa	UV (nm)	Ión Molecular [M-H]-	Fragmentos (m/z)	Referencia
Catequina conjugada	233, 245, 325	289	205	Dueñas y col (2015)
Ác. <i>Trans-p</i> - Cumaroil aldárico	312	355	209, 193, 163	Dueñas y col (2015)
Ác. <i>Trans</i> -feruloil aldárico	326	385	209, 193	Mekky y col (2015)
Ác. Ferúlico	300, 320	193	193, 175	Li y col (2017)
Miricetina	254, 372	317		López y col (2013)
Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido	238, 255, 353	479	316, 271, 256	Mujica y col (2012)
Quercetina-3-(6´malonil)-glucósido	238, 256, 353	549	505, 463, 300, 271	Mekky y col (2015)
Quercetina- <i>O</i> -acétil hexósido	254, 368	505	463, 301	Mekky y col (2015)
Quercetina -3- <i>O</i> -glucósido	238, 256, 353	463	301	Lin y col (2008)
Kaempferol -3- <i>O</i> -glucósido	264, 346	447	285	Mujica y col (2012)
Kaempferol-3-(6´malonil)-glucósido	260, 300, 347	533	511, 489, 307, 285	Mujica y col (2012)
Kaempferol- <i>O</i> -acilhexósido	350	489	285	Dueñas y col (2016)
Kaempferol	232, 246, 366	285	259, 239	Mekky y col (2015)
Trímero de procianidina	280	1083	863, 575	Ross y col (2009)
Dímero de procianidina digalato	282	1067	881, 777	Ross y col (2009)
Genisteína 7- <i>O</i> -β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosido	254, 323	563	431, 269, 175	Mekky y col (2015)

negro Jamapa por HPLC-DAD-MS.



**Figura 8.** Separación de compuestos fenólicos extraídos con etanol al 80% a partir de las fracciones HCC (a) y HCF(b) de frijol común azufrado higuera por LC-DAD- MS (280-350 uv). A, B, C. Compuestos no identificados 1. Ác. Trans-feruloil aldárico 1, 2.

Catequina conjugada, 3. Ác. Trans-feruloíl aldárico 2, 4. Ác. Trans-feruloíl aldárico 3. 5. Ác. Ferúlico, 6. Quercetina-3-(6' malonil)-glucósido, 7. Quercetina-3-O-glucósido. 8. Kaempferol-3-O-glucósido, 9. Kaempferol-3-(6' malonil)-glucósido, 10. Kaempferol-O-acilhexósido, 11. Kaempferol, 12. Tetrámero de procianidina, 13. Trímero de procianidina, 14. Dímero de procianidina digalato.



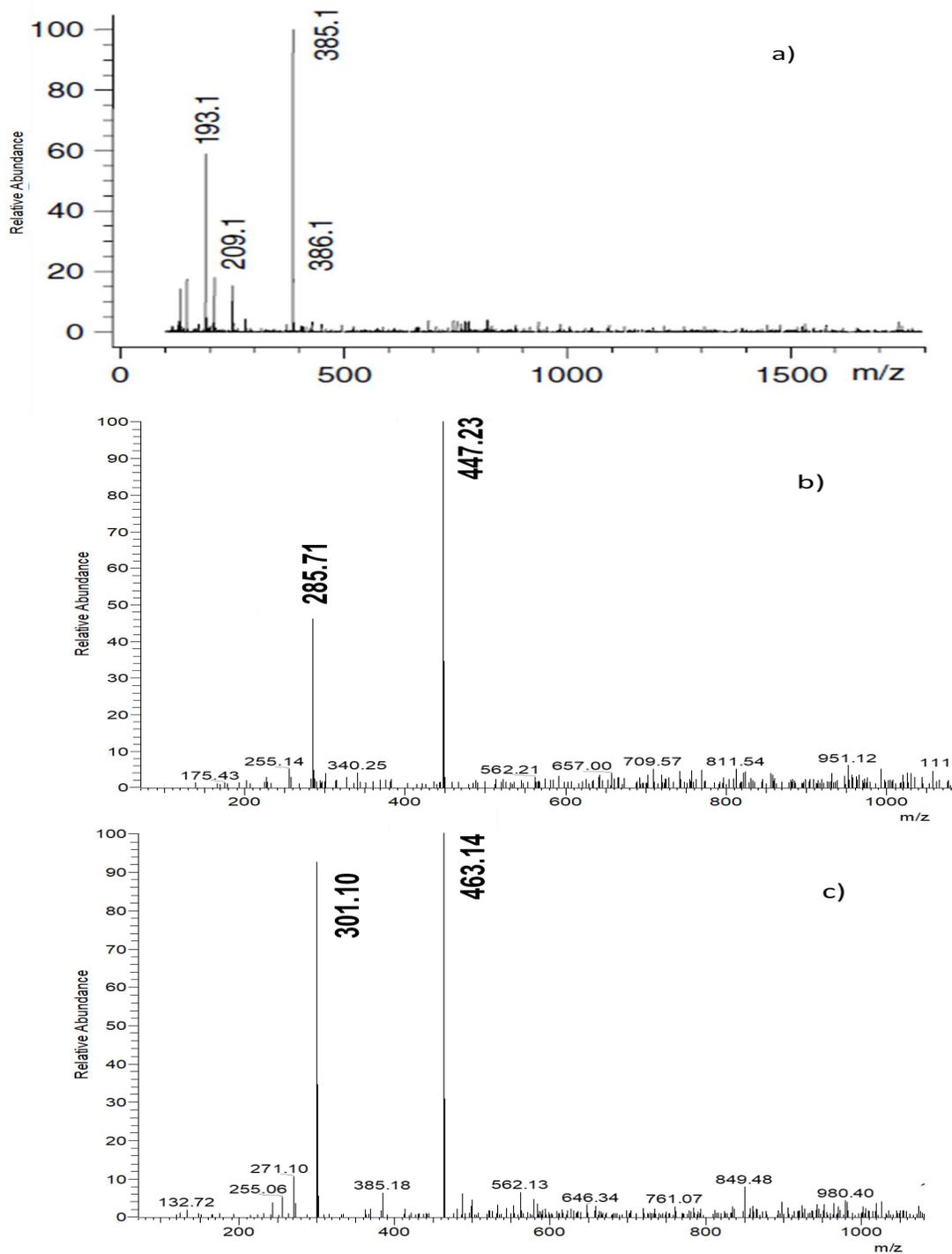
**Figura 9.** Separación de compuestos fenólicos extraídos con etanol al 80% a partir de las fracciones HCC (a) y HCF (b) de frijol común negro Jamapa por LC-DAD- MS (280-350 UV). A, B, C. Compuestos no identificados 1. Catequina conjugada, 2. Ác. Trans-p-cumaroil aldárico, 3. Ác. Trans-feruloíl aldárico 1, 4. Ác. Trans-feruloíl aldárico 2, 5. Genisteína 7-O-β-D-apiofuranosil-(1->6)-β-D-glucopiranosido, 6. Ác. Ferúlico 7.

Miricetina-3-O-glucósido, 8. Quercetina-3-O-glucósido, 9.Quercetina-O-acétil hexóxido, 10. Kaempferol-3-O-glucósido, 11.Miricetina, 12.Kaempferol-3-(6´malonil)-glucósido, 13. Trímero de procianidina, 14. Dímero de procianidina digalato.

ferúlico, y [M-H]<sup>-</sup> de m/z 209 correspondiente a un residuo de ácido aldárico (**Figura 10 a**). Estos compuestos han sido identificados como formas isoméricas de ácido trans-feruloíl aldárico. Dueñas y col (2015) reportaron la existencia de ácidos trans-feruloíl aldárico en frijol común *P. vulgaris*, además López y col (2013) reportaron estos compuestos como mayoritarios en frijol común variedad tolosona.

Se identificaron varios glucósidos de quercetina y kaempferol en el análisis de HPLC-MS. El pico 6 se identificó como Quercetina-3-O-glucósido, presento un ion molecular negativo [M-H]<sup>-</sup> m/z 463 y produjo el ion de fragmentación m/z 301 (quercetina) al perder un residuo de hexosa [M-H]<sup>-</sup> m/z 162 (**Figura 10 c**). Este compuesto fue propuesto como quercetina-3-glucósido o quercetina-3-galactósido por Prati y col (2007), los cuales han sido reportados en frijoles y otras fabáceas. El pico 7 presento un [M-H]<sup>-</sup> m/z 549 tiene el mismo espectro y fragmento de aglicona que el pico 6, pero su ion molecular es 86 una mayor que el pico 6 ó 248 una veces mayor que su aglicona, por lo que corresponde a quercetina-3(6'-malonil)-glucósido. Este compuesto también fue reportado por Lin y col (2008) en extractos de frijol común.

Los picos 8, 9 y 10 fueron identificados como kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-3-(6'-malonil)-glucósido, kaempferol-O-acilhexósido, respectivamente. El pico 8 fue identificado como kaempferol-3-O-glucósido mostrando un ión molecular negativo [M-H]<sup>-</sup>m/z 447 y un ion de fragmentación de m/z 285 (kaempferol) que se produjo al perder un residuo de hexosa [M-H]<sup>-</sup>m/z 162 (**Figura 10 b**) (Abu Reidah y col 2012).



**Figura 10.** Espectro de masas de los compuestos a) ácido ferúlico conjugado con ácido aldárico, b) Kaempferol-3-O-glucósido y c) Quercetina-3-O-glucósido.

El pico 9 tiene el mismo espectro y fragmento de aglicona que el pico 8, pero su ion molecular es 86 una mayor que el pico 8 ó 248 una veces mayor que su aglicona. Así, el pico 9 fue identificado tentativamente como Kaempferol-3-(6´malonil)-glucósido (Lin y col 2008).

El pico 10 presentó un ion molecular negativo  $[M-H]^-$  m/z 489 y produjo un ion de fragmentación de m/z 285, sugiriendo una pérdida de una hexosa y un grupo acil (Dueñas y col 2016). El pico 11 fue identificado como aglicona de kaempferol comparándolo con su estándar comercial y análisis de masas, generando un ion molecular negativo de  $[M-H]^-$  m/z 285 (Mekky y col 2015). Otros compuestos de tipo flavonoides detectados fue catequina conjugada (pico 2), tetrámero de procianidina (pico12), trímero de procianidina (pico 13) y dinero de procianidina (pico 14). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado para frijol común *P. vulgaris* de distintos autores (Abu Reidah y col 2012; López y col 2013). Además de estar presentes en otras leguminosas como lentejas (Dueñas y col 2016), chicharillo (López y col 2013) y garbanzo (Lin y col 2008). Los picos designados con letras A, B y C mostraron un  $[M-H]^-$  m/z 223, 263 y 180, respectivamente. El espectro UV para estos compuestos vario en un rango de 240-270 nm. El ácido sinápico posee un  $[M-H]^-$  m/z 223, sin embargo su espectro UV (230, 320) no coincide con el espectro UV del pico A, por lo cual este compuesto, al igual que el pico B, no fueron identificados. El aminoácido L-tirosina posee un  $[M-H]^-$  m/z 180 y un espectro UV de 230, 272 nm reportado por Aguilera y col (2011) en frijol común. Además Reyes-Bastidas y col (2010) reportaron un incremento de los aminoácidos aromáticos después de la FES, por lo que el pico C se identificó tentativamente como L-tirosina.

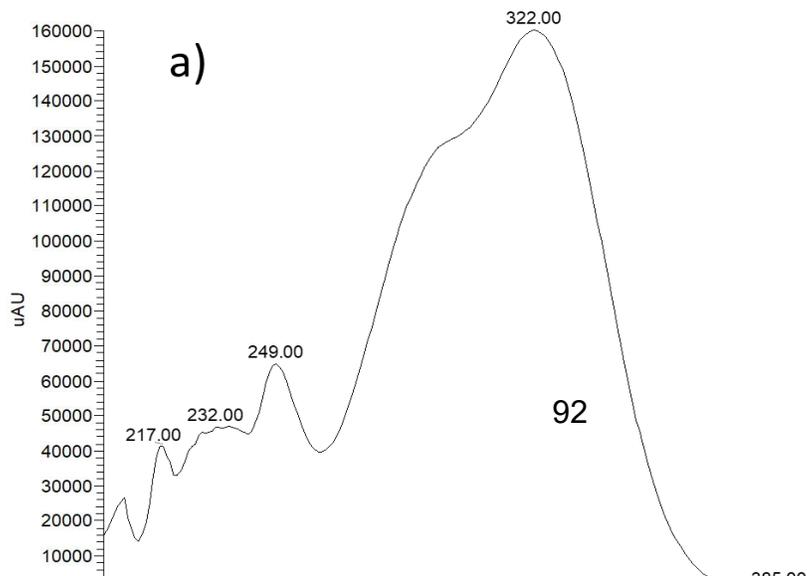
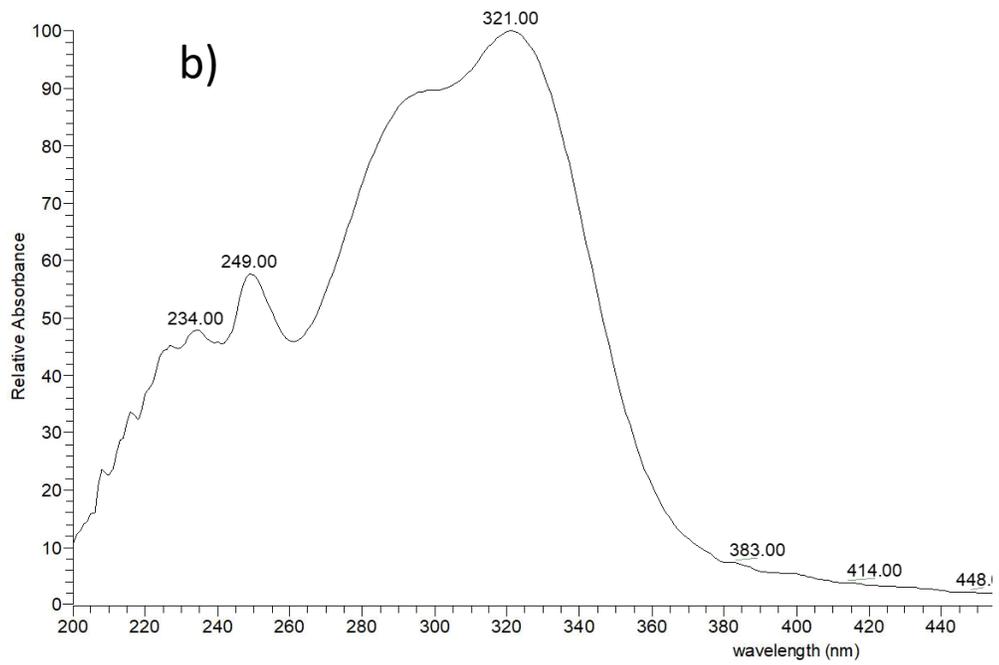
En la **Figura 9** se muestran los cromatogramas de la **HCC** y **HCF** de frijol negro jamapa, en los cuales se identificaron un total de 14 compuestos fenólicos, incluyendo ácidos hidroxicinámicos libres, como el ácido ferúlico (pico 6). Este compuesto fue identificado por comparación en los tiempos de retención y espectro UV con su estándar comercial (**Figura 11**) y confirmado por espectrofotometría de masas. Además de los ácidos hidroxicinámicos libres también se encontraron en forma de esteres. En el análisis de HPLC-MS, el pico 2 presento un ion molecular negativo de  $[M-H]^-$  m/z 355 correspondiente a un ácido aldárico (galactárico o glucárico) ligado a ácido *p*-cumárico, y dos iones de fragmentación m/z 163 correspondiente al residuo de ácido *p*-cumárico, y m/z de 209 correspondiente a un residuo de ácido aldarico.

Los picos 3, y 4 han sido identificados como formas isoméricas de ácido transferuloíl aldárico al igual que en el frijol azufrado higuera.

El pico 5 fue tentativamente identificado como Genisteína 7-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1->6)- $\beta$ -D-glucopiranosido al comparar su ion molecular negativo  $[M-H]^-$  m/z 563 y su patrón de fragmentación 431,269 y 175 con lo reportado por Mekky y col (2015).

Se identificaron 8 compuestos de tipo flavonoide en los extractos etanólicos de frijol negro jamapa. El pico 7 fue identificado como miricina-3-O-glucósido, presentando un ion molecular negativo  $[M-H]^-$  m/z 479 y produjo el ion mayoritario de fragmentación m/z 317 (miricetina) al perder un residuo de hexosa  $[M-H]^-$  m/z 162. Aparicio-Fernández y col (2005) afirman ser los primeros en reportar un glucósido de

miricetina en *P.vulgaris*. Lin y col (2008) señalaron que miricina-3-O-glucósido fue el principal flavonol presente en variedades negras de *P. vulgaris*.



**Figura 11.** Espectro UV de ácido ferúlico. (a) Muestra y (b) Estándar comercial

Los picos 8 y 9 corresponden a quercetina-3-O-glucósido y quercetina-O-acétil hexóxido, respectivamente. El análisis de masas para el pico 8 generó un ion molecular negativo [M-H]<sup>-</sup> m/z 463, así como un fragmento de m/z 301 (quercetina) correspondiente a la pérdida de un residuo de hexosa m/z 162. El pico 9 obtuvo un [M-H]<sup>-</sup> m/z 505 y fragmentos de 463 y 301 lo que corresponden a la pérdida de un residuo de hexosa m/z 162 y un grupo acétil m/z 42. Los picos 10 y 12 corresponden a glucósidos de kaempferol reportados en frijoles pintos por Aguilera y col (2011).

El pico 10 fue identificado como kaempferol-3-O-glucósido mostrando un ion molecular negativo [M-H]<sup>-</sup> m/z 447 y un ion de fragmentación de m/z 285 (kaempferol) que se produjo al perder un residuo de hexosa [M-H]<sup>-</sup> m/z 162. El pico 12 tiene el mismo espectro y fragmento de aglicona que el pico 10, pero su ion molecular es 86 una mayor que el pico 8 ó 248 una veces mayor que su aglicona. Así, el pico 9 fue identificado tentativamente como Kaempferol-3-(6'-malonil)-glucósido (Lin y col 2008). Además se identificó la aglicona de miricetina m/z 317, esta aglicona también fue reportada por Lin y col (2008) donde estudiaron 17 variedades de *P. vulgaris* y la aglicona de miricetina fue identificada únicamente en variedades negras de *P. vulgaris*.

Los picos designados con letras A, B y C al igual que en azufrado higuera mostraron un [M-H]<sup>-</sup> m/z 223, 263 y 180, respectivamente y el espectro UV para estos compuestos vario en un rango de 240-270 nm. Los picos A y B se reportaron como compuestos no identificados y el pico C fue identificado tentativamente como L-tirosina.

## **2. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre el contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales de harinas de frijol común**

En el **Cuadro 14** se presenta el contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales identificados en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. Se puede observar que el frijol sin procesar de la variedad azufrado higuera presentó una cantidad significativamente mayor (243.23 µg/g) de compuestos fenólicos identificados que la variedad negro jamapa (161.32 µg/g). Los compuestos identificados en estas variedades de frijol correspondieron a los grupos ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles e isoflavonas. En la literatura se ha reportado que los compuestos fenólicos no flavonoides como los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en mayor contenido en el cotiledón, mientras que los flavonoides su mayor contenido se encuentra en la cubierta seminal (cascarilla o testa) de la semilla (Akillioglu y col 2010). En el presente trabajo de investigación este no fue el caso, ya que tanto el cotiledón como la testa de las dos variedades estudiadas presentaron mayores contenidos de flavonoides que de ácidos

hidroxicinámicos (datos no mostrados). El frijol variedad azufrado higuera sin procesar presentó un mayor contenido de flavonoles (180.93  $\mu\text{g/g}$ ), con un 74.40% de los compuestos fenólicos totales identificados, seguido por el contenido de flavanoles (43.30  $\mu\text{g/g}$ ) y ácidos hidroxicinámicos (18.99  $\mu\text{g/g}$ ) los que representan el 17.80% y 7.81%, respectivamente, del total de los compuestos fenólicos identificados. En esta variedad de frijol no fueron identificados compuestos fenólicos correspondientes al grupo de las isoflavonas.

**Cuadro 14.** Contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales identificados en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido.

Componente (µg/g)	Azufrado Higuera				Negro Jamapa			
	HFSP <sup>1</sup>	HFRC <sup>2</sup>			HFSP <sup>1</sup>	HFRC <sup>2</sup>		
		HCC <sup>3</sup>	HT <sup>4</sup>	TOTAL <sup>5</sup>		HCC <sup>3</sup>	HT <sup>4</sup>	TOTAL <sup>5</sup>
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 1	nd	nd	nd	nd	6.81 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.37 ± 0.03 <sup>b</sup>
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 2	6.05 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.62 ± 0.09 <sup>d</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>e</sup>	3.80 ± 0.10 <sup>cd</sup>	11.86 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.77 ± 0.17 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>e</sup>	3.97 ± 0.17 <sup>c</sup>
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 3	6.85 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.08 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>d</sup>	5.31 ± 0.11 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd
Ác. <i>Trans-p</i> -cumaroil aldárico	nd	nd	nd	nd	5.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>d</sup>	2.38 ± 0.03 <sup>b</sup>
Ác. Ferúlico	6.08 ± 0.37 <sup>b</sup>	5.41 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>f</sup>	5.63 ± 0.03 <sup>c</sup>	8.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.13 <sup>e</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>f</sup>	4.66 ± 0.12 <sup>d</sup>
<b>Sub- total</b>	<b>18.99<sup>b</sup></b>	<b>14.12<sup>e</sup></b>	<b>0.63<sup>h</sup></b>	<b>14.75<sup>c</sup></b>	<b>32.34<sup>a</sup></b>	<b>13.44<sup>f</sup></b>	<b>0.96<sup>g</sup></b>	<b>14.40<sup>d</sup></b>
<b>Flavonoles</b>								
Catequina conjugada	7.99 ± 0.34 <sup>f</sup>	11.92 ± 0.19 <sup>e</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>g</sup>	12.68 ± 0.17 <sup>d</sup>	18.13 ± 0.11 <sup>a</sup>	15.55 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.00 <sup>h</sup>	16.01 ± 0.02 <sup>b</sup>
Tetramero de procianidina	7.46 ± 0.42 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.01 <sup>d</sup>	5.23 ± 0.07 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd
Trímero de procianidina	15.42 ± 0.26 <sup>cd</sup>	15.00 ± 0.74 <sup>d</sup>	2.30 ± 0.04 <sup>e</sup>	17.31 ± 0.75 <sup>c</sup>	33.47 ± 1.99 <sup>a</sup>	31.07 ± 1.85 <sup>b</sup>	3.04 ± 0.01 <sup>e</sup>	34.12 ± 1.84 <sup>a</sup>
Dímero de procianidina digalato	12.41 ± 1.86 <sup>c</sup>	11.92 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.70 ± 0.07 <sup>e</sup>	13.63 ± 0.07 <sup>b</sup>	16.74 ± 0.32 <sup>a</sup>	9.93 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>f</sup>	10.36 ± 0.06 <sup>d</sup>
Genisteína <sup>6</sup>	nd	nd	Nd	nd	24.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.53 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.73 ± 0.15 <sup>b</sup>
<b>Sub- total</b>	<b>43.30<sup>e</sup></b>	<b>43.53<sup>e</sup></b>	<b>5.32<sup>f</sup></b>	<b>48.85<sup>d</sup></b>	<b>92.80<sup>a</sup></b>	<b>61.11<sup>c</sup></b>	<b>4.13<sup>f</sup></b>	<b>65.24<sup>b</sup></b>
<b>Flavonoles</b>								
Quercetina-3-(6'-malonil)-glucósido	8.44 ± 0.19 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.20 <sup>c</sup>	3.12 ± 0.01 <sup>d</sup>	9.68 ± 0.20 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
Quercetina-3-O-glucósido	7.59 ± 0.21 <sup>d</sup>	6.72 ± 0.11 <sup>g</sup>	2.60 ± 0.04 <sup>h</sup>	9.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	8.97 ± 0.01 <sup>c</sup>	7.32 ± 0.02 <sup>e</sup>	3.83 ± 0.00 <sup>g</sup>	11.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
Quercetina-O-acetil hexósido	nd	nd	nd	nd	3.14 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.82 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.80 ± 0.02 <sup>d</sup>	3.62 ± 0.05 <sup>a</sup>
Kaempferol-3-O-glucósido	126.50 ± 5.49 <sup>a</sup>	93.45 ± 5.20 <sup>c</sup>	21.82 ± 0.19 <sup>d</sup>	115.28 ± 5.13 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.01 <sup>ef</sup>	6.04 ± 0.17 <sup>ef</sup>	5.08 ± 0.00 <sup>f</sup>	11.12 ± 0.17 <sup>e</sup>
Kaempferol-3-(6'-malonil)-glucósido	16.50 ± 0.35 <sup>c</sup>	22.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.41 ± 0.21 <sup>d</sup>	29.52 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.05 <sup>f</sup>	3.08 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.03 ± 0.02 <sup>h</sup>	4.11 ± 0.00 <sup>e</sup>
Kaempferol-O-acilhexósido	5.38 ± 0.06 <sup>c</sup>	7.97 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.01 <sup>d</sup>	9.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
Kaempferol	16.50 ± 0.33 <sup>b</sup>	7.57 ± 0.11 <sup>d</sup>	13.01 ± 0.51 <sup>c</sup>	20.59 ± 0.62 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
Miricetina-3-O-glucósido	nd	nd	nd	nd	9.56 ± 0.08 <sup>b</sup>	8.85 ± 0.09 <sup>c</sup>	6.14 ± 0.01 <sup>d</sup>	14.99 ± 0.10 <sup>a</sup>
Miricetina	nd	nd	nd	nd	3.48 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.34 ± 0.00 <sup>d</sup>	3.84 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Sub- total</b>	<b>180.93<sup>b</sup></b>	<b>144.40<sup>c</sup></b>	<b>49.47<sup>d</sup></b>	<b>193.87<sup>a</sup></b>	<b>36.18<sup>e</sup></b>	<b>30.62<sup>e</sup></b>	<b>18.24<sup>f</sup></b>	<b>48.86<sup>d</sup></b>
<b>Total</b>	<b>243.23<sup>b</sup></b>	<b>202.06<sup>c</sup></b>	<b>55.43<sup>g</sup></b>	<b>261.17<sup>a</sup></b>	<b>161.32<sup>d</sup></b>	<b>105.17<sup>f</sup></b>	<b>23.34<sup>h</sup></b>	<b>128.52<sup>e</sup></b>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra en un mismo renglón no son diferentes (Duncan,  $p \leq 0.05$ ); 1 Harina de frijol sin procesar, 2 Harina de frijol remojado-cocido, 3 Harina de cotiledón cocido, 4 Harina de testa; 5 Suma de HCC y HT, 6 Genisteína 7-O-β-D-apiofuranosil-(1->6)-β-D-glucopiranosido

En el caso de la variedad negro jamapa, éste presentó mayor contenido de compuestos correspondientes al grupo de flavanoles (65.24 µg/g) que representan el 57.52% del total de fenólicos identificados, seguido del contenido de compuestos flavonoles (36.18 µg/g), isoflavonas (24.46 µg/g) y ácidos hidroxicinámicos (32.34 µg/g) los que representan el 22.91%, 15.16% y 16.76%, respectivamente, del total de los compuestos fenólicos identificados.

En el **Cuadro 14** también se muestra el contenido de compuestos fenólicos identificados en el grano de frijol remojado-cocido, así como el contenido de compuestos fenólicos en las fracciones cotiledones y testas de este grano procesado por remojo y cocción (etapas de acondicionamiento del grano para llevar a cabo el bioproceso de **FES**). De manera general se observa que los cotiledones representan un mayor contenido (77.37% en la variedad azufrado higuera y 81.83% en la variedad negro Jamapa) de compuestos fenólicos en el frijol remojado-cocido, que las cascarillas (testas), excepto para el caso del Kaempferol en la variedad azufrado higuera; esto ocurrió a pesar de que las cascarillas presentaron concentraciones (datos no mostrados) mucho mayores de cada uno de los compuestos fenólicos identificados. Esto se debe, básicamente, a que los cotiledones representan un porcentaje mayor al 90% del grano de frijol remojado-cocido. González de Mejía y col (1999) observaron que las principales cantidades de compuestos de polifenoles se encontraban en la cubierta de semilla de la variedad Flor de Mayo de frijol común mexicano y representó el 11% de la semilla total, similar a lo encontrado en el presente trabajo de investigación. Al analizar esta información por grupos de compuestos fenólicos encontramos que los ácidos hidroxicinámicos presentes en los

cotiledones representan entre el 93.33 y 95.73% del contenido de estos compuestos en los granos de frijol remojados cocidos, mientras que en el caso de los flavanoles y flavonoles presentes en los cotiledones, éstos representan 89.11 - 93.50% y 62.67 - 74.48% del contenido de este tipo de compuestos presentes en los granos de frijol remojados-cocidos. En el caso de las isoflavonas, éstas solo fueron identificadas en el frijol variedad negro jamapa, y su contenido en cotiledones representa un 95.77% del contenido en el frijol remojado-cocido.

Al analizar el efecto de los procesos de remojo y cocción sobre el contenido de compuestos fenólicos totales nos damos cuenta que en ambas variedades de frijol estos procesos de manera general causaron disminución en el contenido de compuestos fenólicos totales (-15.07% en la variedad azufrado higuera y 7.97% en la variedad negro jamapa), sin embargo, este comportamiento no fue general para todos los compuestos identificados en estos materiales de frijol. En el caso de los compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los ácidos hidroxicinámicos los procesos de remojo y cocción causaron una disminución (-22.33% y -35.54% para azufrado higuera y negro jamapa, respectivamente), mientras que los compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de flavonoles aumentaron (+7.15% y +35.05% para azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente) por efecto de estos procesos. En el caso de los compuestos flavanoles, este grupo presentó un comportamiento diferente en cada variedad de frijol frente al procesamiento por remojo y cocción; en la variedad azufrado higuera, este grupo de compuestos aumentó (+12.82%), mientras que en la variedad negro Jamapa, estos compuestos disminuyeron (-11.46%). Para el caso de isoflavonas se puede observar que su contenido disminuyó

(-80.66%) drásticamente por efecto de las etapas de remojo y cocción en los granos de frijol variedad negro Jamapa. Guzmán-Tovar y col (2009) analizaron 16 genotipos del frijol negro mexicano y reportaron un alto contenido total de compuestos fenólicos en la semilla cruda el cual se redujo (-50%) después del proceso de cocción, aunque esta disminución fue diferente entre los genotipos estudiados. Al contrastar estos resultados con los de la presente investigación, se puede decir que las pérdidas encontradas aquí fueron pequeñas (-7.38% y -15.07%) con los resultados mencionados anteriormente (-50%).

En las siguientes secciones se presenta un análisis detallado del contenido de compuestos fenólicos de manera individual para cada grupo identificado, así como el efecto de los procesos de remojo y cocción sobre el contenido de estos compuestos de manera individual.

#### **a. Compuestos hidroxicinámicos**

En el **Cuadro 14** se presenta el contenido de compuestos fenólicos hidroxicinámicos identificados en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. La **HFSP** de la variedad negro jamapa presentó un contenido ligeramente mayor (32.34 µg/g) de compuestos hidroxicinámicos que la **HFSP** de la variedad azufrado higuera (18.99 µg/g). Estos compuestos representaron el 7.81% y el 16.76% del total de compuestos fenólicos identificados en azufrado higuera y negro jamapa, respectivamente. El ácido *trans*-feruloíl aldárico fue identificado dos veces y es el mayoritario en frijol azufrado

higuera (12.90  $\mu\text{g/g}$ ) y negro jamapa (8.67  $\mu\text{g/g}$ ), seguido del ácido ferúlico (6.08  $\mu\text{g/g}$ ) y (8.25  $\mu\text{g/g}$ ), respectivamente. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el frijol común de ambas variedades es rico en ácido ferúlico y sus derivados aldáricos; Además, el ácido *trans*-cumaroíl aldárico también fue identificado en la variedad negro Jamapa, y presentó un contenido de 5.42  $\mu\text{g/g}$  en **HFSP**. Se ha reportado en literatura que los ácidos gálico, vanílico, cumarico, sinapico, ferúlico y clorogénico son los principalmente encontrados en el frijol común, ya sea crudo o cocido (Chávez-Mendoza y Sánchez 2017). Un estudio realizado por Espinosa-Alonso y col (2006) demostraron que el ácido ferúlico fue el ácido fenólico principalmente encontrado en 62 líneas del frijol mexicano silvestre. Este resultado concuerda con lo encontrado en este trabajo de investigación. Asimismo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Dueñas y col (2005) y Aguilera y col (2010).

En general, el acondicionamiento (remojo, cocción) del grano de frijol ocasiono importantes disminuciones en estos compuestos (-22.33% y -35.54% en frijol azufrado higuera y negro jamapa, respectivamente). Las pérdidas pueden ser simplemente el resultado de la lixiviación de estos compuestos al agua de remojo y cocción, o compuestos polifenoles unidos a carbohidratos o proteínas, las cuales son pérdidas en estas etapas de acondicionamiento del grano de frijol (Martín-Cabrejas y col 2009). Xu y col (2009) reportaron una disminución significativa de compuestos fenólicos totales, flavonoides y contenido de taninos condensados después del procesamiento (remojo y cocción) de frijoles pinto y negro. Concluyendo que el procesamiento causa cambios complejos en la composición química y puede causar degradación de polifenoles y liberación de compuestos fenólicos ligados. Algunos

estudios han demostrado que la cocción no afecta el contenido de estos ácidos fenólicos, aunque algunos autores han informado lo contrario (Chávez-Mendoza y Sánchez 2017). El efecto de un tratamiento térmico de cocción sobre el contenido de ácidos fenólicos también se ha reportado para algunas variedades del frijol mexicano común, como lo reportado por Díaz-Batalla y col (2006) quienes encontraron una disminución del 26.3 al 66.3% y del 15.5% al 36.5% del contenido de los ácidos hidroxicinámicos *p*-cumárico y ferúlico durante el proceso de cocción de estas muestras de frijol común; cabe mencionar que estos investigadores reportaron pérdidas durante la cocción de otros ácidos fenólicos no identificados en la presente investigación. Martínez y col (2003) también cuantificaron ácidos fenólicos como gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, ferúlico y *p*-cumárico en las variedades Jamapa y Mayocoba de frijol negro en sus formas cruda y cocida. Ellos reportaron que el procesamiento térmico solo afectaba a los ácidos gálico y *p*-hidroxibenzoico, mientras que el resto permaneció constante.

#### **b. Catequinas y procianidinas (flavanoles)**

En el **Cuadro 14** se presenta el contenido de catequinas y procianidinas o taninos condensados (compuestos flavanoles) identificados en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. Estos compuestos, usualmente relacionados con testas coloreadas fueron identificados en menor cantidad en **HFSP** de la variedad azufrado higuera con un total 43.30 µg/g, representando el 17.80% de compuestos fenólicos totales presentes

en el grano, y como componentes mayoritarios en **HFSP** de la variedad negro jamapa con un total de 92.82 µg/g, representando el 58.16% de compuestos fenólicos presentes en el grano. Después del procesamiento de remojo y cocción de los granos de frijol común se presentó disminución del 11.46% en estos compuestos en la variedad negro jamapa y un aumento del 12.48% en la variedad azufrado higuera. En literatura se reportó que el aumento de flavanoles en cotiledón cocido puede ser contribuido predominantemente por los incrementos en catequina, la cual pudo liberarse de la estructura de taninos condensados a través del proceso de despolimerización ocasionado por el tratamiento térmico (Xu y col 2009). Asimismo, Xu y col (2009) reportaron una disminución significativa de compuestos flavonoides y taninos condensados después del procesamiento (remojo y cocción) de frijol pinto y negro. Ellos concluyeron que el procesamiento causa cambios complejos en la composición química y puede causar degradación de polifenoles y liberación de compuestos fenólicos ligados. También, polifenoles como los taninos tienen la capacidad unirse carbohidratos y proteínas, las cuales son perdidas en las etapas de remojo y cocción del grano de frijol (Martín-Cabrejas y col 2009).

### **c. Flavonoles**

En el **Cuadro 14** se presenta el contenido de compuestos flavonoles identificados en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. Los flavonoles fueron el grupo mayoritario de compuestos fenólicos en frijol azufrado higuera aportando el 74.40% de los

compuestos fenólicos totales, mientras que, en la variedad negro jamapa este grupo aportó el 23.91% del total de compuestos fenólicos identificados. En la variedad azufrado higuera fueron identificados flavonoles glucosilados de quercetina y kaempferol, así como la aglicona kaempferol. El Kaempferol-3-O-glucósido fue el compuesto más importante (126.50  $\mu\text{g/g}$ ) en esta variedad de frijol, representando el 69.91% del contenido de flavonoles, y se le relaciona con el color amarillo del grano (Beninger y Hosfield 2003). En el caso de la variedad negro jamapa fueron identificados flavonoles glucosilados de quercetina, kaempferol y miricetina, así como la aglicona miricetina; los compuestos quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-glucósido y miricetina-3-O-glucósido fueron los compuestos más importantes (8.97, 7.37 y 9.56  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) en esta variedad de frijol, representando el 71.59% del contenido de flavonoles. Compuestos similares fueron detectados en frijol común por Huber y col (2016), a excepción que ellos no detectaron glucosido de miricetina y ni su aglicona. Espinosa-Alonso y col (2006) reportaron que tanto kaempferol como quercetina fueron los principales flavonoides encontrados en 62 líneas de frijol silvestre mexicano. Guajardo-Flores y col (2012) reportaron el perfil de flavonoides del frijol negro mexicano de la variedad Negro San Luis, y encontraron que los flavonoides más importantes fueron quercetina 4-O-galactósido, miricetina 3-O-glucósido y kaempferol 3-O-glucósido en esta variedad de frijol. También, Aparicio-Fernández y col (2005) detectaron kaempferol-3-glucósido, quercetina-3-glucósido y miricetina glucosilada en frijol común. Estos autores señalaron que rara vez ha sido documentado la presencia de miricetina glucosilada en este frijol. Aunque Beninger y Hosfield (2003) indicaron que los flavonoides existen principalmente en la forma

glicosilada, las muestras analizadas de ambas variedades de frijol evaluadas en este estudio también contenían agliconas de flavonoles como kaempferol y miricetina, en las variedades azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente. Dinelli y col (2006) reportaron la presencia de estos compuestos en formas libres y conjugadas como los principales flavonoles en leguminosas.

En general se observó un incremento de compuestos flavonoles del 7.15% y 35.05% en las variedades azufrado higuera y negro jamapa, respectivamente, después del procesamiento de remojo y cocción de los granos de frijol. El Kaempferol-3-*O*-glucósido fue el único flavonol que disminuyó (-8.87%) durante estos procesos de remojo y cocción en la variedad azufrado higuera. Huber y col (2016) reportaron resultados similares. Ellos estudiaron el contenido de compuestos flavonoides de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de color café antes y después del proceso de cocción, con y sin remojo. Estos investigadores observaron que para todos los flavonoides hubo una diferencia significativa entre los extractos de frijol sin procesar y cocido, los primeros siempre exhibieron resultados inferiores. El efecto del remojo varió para cada compuesto que ellos evaluaron; sin embargo, el aumento de kaempferol y kaempferol-3-rutinósido durante este proceso fue muy claro. Estos resultados son contrarios a los reportes publicados que afirman que cocer y remojar los granos de frijol tienen un impacto negativo en las concentraciones de flavonoides. Asimismo, estos autores también reportaron que fue notable que la quercetina y la quercetina-3-glucósido no fueron influenciados por la cocción, con o sin remojo, mientras que Amarowicz y Peggy (2008) y Díaz-Batalla y col (2006), reportaron que la concentración de quercetina se redujo en un 12-65% y 40%, respectivamente,

después de que el frijol fue cocido. Hace falta mayor investigación para entender el mecanismo por el cual el contenido de compuestos flavonoles incrementa en los granos de frijol común por efecto de los procesos de remojo y cocción. Como se mencionó anteriormente, la reducción en flavonoles después del procesamiento se le puede atribuir parcialmente al remojo y difusión de compuestos al agua de remojo (Akillioglu y Karakaya 2010).

#### **d. Isoflavonas**

En el **Cuadro 14** se presenta el contenido de isoflavonas identificadas en harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido. Solo en la variedad negro Jamapa fueron identificados este tipo de compuestos fenólicos. La única isoflavona identificada en esta variedad de frijol fue Genisteína con un contenido de 24.46  $\mu\text{g/g}$ , lo cual representa un 16.16% del contenido total de compuestos fenólicos identificados en el frijol negro jamapa. El frijol común no se reconoce como una fuente de isoflavonas, la soya es la leguminosa que exhibe el mayor contenido de estos compuestos. Sin embargo, algunos estudios han demostrado la presencia de estos compuestos en el frijol común (Chávez-Mendoza y Sánchez 2017). Lima y col (1999) reportaron la presencia de formas no glicosiladas de las isoflavonoides daidzeína y genisteína en 16 genotipos de germoplasma de frijol común brasileño. Estos autores encontraron que los granos del tipo negro mostraron las concentraciones más altas de isoflavonoides y fueron los únicos que exhibieron daidzeína. Sin embargo, el contenido de isoflavonoides obtenido en los genotipos de

frijol evaluados fue muy bajo en comparación con el obtenido en los granos de soya (600-950  $\mu\text{g/g}$ ). Díaz-Batalla y col (2006) analizaron diez variedades cultivadas y cuatro silvestres de semillas mexicanas de frijol común, y reportaron que la presencia de daidzeína y genisteína en harina de semillas de frijol crudo y cocido no fue confirmada por los espectros UV. Sin embargo, durante la germinación de las siete muestras de semillas de frijol común (cinco cultivadas y dos silvestres), hubo génesis de daidzeína y genisteína, y los valores de daidzeína variaron de 8.2 a 129.1  $\mu\text{g/g}$  y los de genisteína de 2.6 a 9.7  $\mu\text{g/g}$ . Resultados similares fueron obtenidos por Guajardo-Flores y col (2012), en la variedad mexicana de frijol negro San Luis; estos autores reportaron que la genisteína se detectó solo después de tres días de germinación, en concentraciones que oscilaron entre 1.2 y 3.1  $\mu\text{g/g}$ .

Se puede observar en el **Cuadro 14** que el contenido de genisteína disminuyó (80.66%) drásticamente después de los procesos de remojo y cocción de los granos de frijol negro Jamapa. No existen reportes en la literatura acerca de las pérdidas de esta isoflavona en frijol común por efecto de los procesos de remojo y cocción.

### **3 Efecto de la FES sobre el contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales en harinas de cotiledón cocido de frijol común**

En el **Cuadro 15** se presenta el contenido de compuestos fenólicos identificados en harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por **FES**, de las variedades azufrado higuera y negro jamapa. Se puede observar que el cotiledón cocido sin fermentar de la variedad azufrado higuera presentó una cantidad

significativamente mayor (218.27  $\mu\text{g/g}$ ) de compuestos fenólicos identificados que la variedad negro Jamapa (112.10  $\mu\text{g/g}$ ).

**Cuadro 15.** Contenido de compuestos fenólicos hidrofílicos individuales identificados en harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por **FES**.

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Medias con la misma letra en un mismo renglón no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ ); 1 Harina de cotiledón cocido, 2 Harina de cotiledón fermentado, 3 Genisteína 7-O- $\beta$ -

Componente	Azufrado Higuera		Negro Jamapa	
	HCC <sup>1</sup>	HCF <sup>2</sup>	HCC <sup>1</sup>	HCF <sup>2</sup>
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>				
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 1	nd	15.33 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.39 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	5.70 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 2	3.92 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	2.71 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	4.16 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	6.59 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
Ác. <i>Trans</i> feruloil aldárico 3	5.40 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	6.11 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	nd	nd
Ác. <i>Trans-p</i> -cumaroil aldárico	nd	nd	2.35 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	3.54 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Ác. Ferúlico	5.84 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.13 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	4.61 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	3.85 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Sub- total ( $\mu$ g/g)	<b>15.17<sup>c</sup></b>	<b>27.29<sup>a</sup></b>	<b>14.52<sup>d</sup></b>	<b>19.69<sup>b</sup></b>
<b>Flavanoles</b>				
Catequina conjugada	12.76 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>	30.94 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	16.76 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	31.64 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
Tetrámero de procianidina	5.06 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	11.04 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>		
Trímero de procianidina	16.40 $\pm$ 0.96 <sup>d</sup>	22.57 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	32.38 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	29.15 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
Dímero de procianidina digalato	12.81 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	22.57 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	10.74 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	10.98 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>
Genisteína <sup>3</sup>	nd	nd	4.80 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	20.68 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
Sub- total ( $\mu$ g/g)	<b>47.06<sup>c</sup></b>	<b>87.14<sup>b</sup></b>	<b>64.70<sup>d</sup></b>	<b>92.46<sup>a</sup></b>
<b>Flavonoles</b>				
Quercetina-3-(6'-malonil)-glucósido	7.12 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	7.52 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	nd	nd
Quercetina-3-O-glucósido	7.31 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	8.67 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	7.88 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	10.74 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Quercetina-O-acétil hexósido	nd	nd	3.04 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Kaempferol-3-O-glucósido	101.08 $\pm$ 7.86 <sup>a</sup>	81.94 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	6.49 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	5.11 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>
Kaempferol-3-(6'-malonil)-glucósido	23.82 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	11.17 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	3.31 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.85 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>
Kaempferol-O-acilhexósido	8.61 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	6.95 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	nd	nd
Kaempferol	8.10 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	24.64 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	nd	nd
Miricetina-3-O-glucósido	nd	nd	9.47 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.41 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>
Miricetina	nd	nd	2.67 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Sub- total ( $\mu$ g/g)	<b>156.07<sup>a</sup></b>	<b>140.91<sup>b</sup></b>	<b>32.88<sup>c</sup></b>	<b>31.96<sup>c</sup></b>
Total ( $\mu$ g/g)	<b>218.27<sup>b</sup></b>	<b>255.34<sup>a</sup></b>	<b>112.10<sup>d</sup></b>	<b>144.11<sup>c</sup></b>

D-apiofuranosil-(1->6)- $\beta$ -D-glucopiranosido

Los compuestos fenólicos identificados en cotiledón cocido de frijol azufrado higuera y negro jamapa son exactamente los mismos que se reportaron y discutieron

en la sección anterior para el frijol integral remojado-cocido. En general los compuestos identificados correspondieron a los grupos ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles e isoflavonas. El contenido de estos compuestos en el cotiledón cocido de frijol variedad azufrado higuera presentó un mayor contenido de flavonoles (156.07  $\mu\text{g/g}$ ), con un 71.50% de los compuestos fenólicos totales identificados, seguido por el contenido de falvanoles (47.06  $\mu\text{g/g}$ ) y ácidos hidroxicinámicos (15.17  $\mu\text{g/g}$ ) los que representan el 21.56% y 6.95%, respectivamente, del total de los compuestos fenólicos identificados. En esta variedad de frijol no fueron identificados compuestos fenólicos correspondientes al grupo de las isoflavonas. En el caso de la variedad negro Jamapa, éste presentó mayor contenido de compuestos correspondientes al grupo de flavanoles (59.90  $\mu\text{g/g}$ ) que representan el 53.43% del total de fenólicos identificados, seguido del contenido de compuestos flavonoles (32.88  $\mu\text{g/g}$ ), ácidos hidroxicinámicos (14.52  $\mu\text{g/g}$ ) e isoflavonas (4.80  $\mu\text{g/g}$ ) y los que representan el 29.33%, 12.95% y 4.28%, respectivamente, del total de los compuestos fenólicos identificados en este frijol.

En el **Cuadro 15** también se muestra el contenido de compuestos fenólicos identificados en el grano de frijol bioprocesado por **FES**. Al analizar el efecto del bioproceso de **FES** sobre el contenido de compuestos fenólicos nos damos cuenta que en ambas variedades de frijol, este bioproceso, de manera general causó aumento en el contenido total de compuestos fenólicos (+16.98% en la variedad azufrado higuera y +28.55% en la variedad negro Jamapa), sin embargo, este comportamiento no fue general para todos los compuestos identificados en estos materiales de frijol. En el caso de los compuestos fenólicos pertenecientes al grupo

de los ácidos hidroxicinámicos, el bioproceso de **FES** causó un aumento (+79.89% y +35.61% para azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente) significativo. Durante la **FES** también aumentaron (+85.17% y +19.83% para azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente) los compuestos flavanoles, mientras que los compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de flavonoles disminuyeron (-9.71%) en el caso del frijol azufrado higuera y se mantuvieron sin cambios en la variedad negro Jamapa. Para el caso de isoflavonas se puede observar que su contenido aumentó (+330.83%) interesantemente por efecto del bioproceso de **FES** en los cotiledones de frijol variedad negro Jamapa.

En cuanto a los cambios en los compuestos fenólicos individuales del grupo de los ácidos hidroxicinámicos se puede observar la aparición de ácido trans-feruloíl aldárico 1 en el cotiledón de frijol azufrado higuera por acción de la **FES**. Wijayanti y col (2017) reportaron que la fermentación puede inducir la degradación estructural de la pared celular que causa la liberación y / o síntesis de los compuestos bioactivos. En cuanto a la síntesis de compuestos, se ha reportado en la literatura la formación de aldehídos en otras leguminosas que fueron sometidas a bioprocesos como fermentación, germinación o la adición de diferentes enzimas (Dueñas y col 2005; López-Amoros y col 2006). Por otro lado, durante la fermentación, los compuestos fenólicos ligados pueden liberarse enzimáticamente (Zhang y col, 2012). Sadh y col (2017) reportaron que el aumento en el contenido fenólico de las muestras puede deberse a la acción enzimática de las amilasas producidas por el hongo, ya que su actividad en las muestras fermentadas es más alta que la de las muestras no fermentadas. Por otro lado, se observó que la **FES** disminuyó la cantidad de ácido

ferúlico en 46.4% y 16.5%, en cotiledones de frijol azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente. Esta disminución también fue reportada por Dueñas y col (2012), en soya fermentada por diferentes microorganismos. Esta disminución en el contenido de ácido ferúlico podría respaldar de alguna manera la hipótesis de la síntesis de compuestos fenólicos como el ácido *trans*-feruloíl aldárico 1 durante la **FES** a partir del ácido ferúlico, como fue mencionado arriba.

Respecto a los cambios en los compuestos fenólicos individuales del grupo de los compuestos flavanoles se puede ver que aumentaron significativamente la catequina conjugada, así como los dímeros, trímeros y tetrámeros de procianidina (taninos conjugados). En literatura se ha reportado que durante proceso de fermentación el hongo produce enzimas que liberan compuestos químicos superiores de la planta como flavonoides, taninos, alcaloides y fenilpropanoides (Nazarni y col 2016). En general se ha dice que los microorganismos en la fermentación contribuyen a la simple conversión fenólica y la despolimerización de compuestos fenólicos con alto peso molecular como los taninos condensados (Othman y col 2009). Sin embargo, en la presente investigación se encontró que la **FES** incrementó los taninos condensados identificados. Esto puede deberse a que el hongo *R. oligosporus* no produce las enzimas que pudieran despolimerizar este tipo de compuestos fenólicos identificados en esta investigación. Su incremento podría estar relacionado con la liberación de este tipo de compuestos por acción de las amilasas producidas por el hongo, como fue reportado anteriormente para los ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, el aumento de la catequina conjugada podría

deberse a la liberación de ésta a partir de otro tipo de compuestos poliméricos que la contienen, y que no fueron identificados en la presente investigación.

En el caso de los flavonoles, como se mencionó arriba, la **FES** causó cambios variados en el contenido de éstos, mientras unos compuestos aumentaron, otros disminuyeron significativamente. Los principales cambios que ocurrieron en estos compuestos en la variedad azufrado higuera fue la disminución pronunciada de Kaempferol-3-*O*-glucósido y Kaempferol-3-(6'-malonil)-glucósido por efecto de la **FES**. En esta variedad de frijol también se presentó un aumento significativo de Kaempferol debido al bioproceso de **FES**. Para la variedad negro Jamapa el principal cambio que ocurrió fue una alta disminución de miricetina-3-*O*-glucósido y un aumento de Miricetina. La disminución de algunos glucósidos de kaempferol y miricetina podría ser el origen del aumento de Kaempferol y Miricetina. Dueñas y col (2012) analizaron la modificación en compuestos bioactivos por fermentación con diferentes microorganismos, y encontraron que el contenido de flavonoles en soya incremento con algunos microorganismos, y disminuyó con otros. Se ha reportado que las enzimas involucradas en la liberación de compuestos fenólicos dependen de los microorganismos empleados en la fermentación. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster de la estructura de la pared celular de los granos, que unen los compuestos fenólicos. En consecuencia, los compuestos fenólicos libres, así como las formas ligadas están más disponibles para su extracción. Entre estas enzimas, la  $\beta$ -glucosidasa se ha descrito ampliamente como una enzima responsable de catalizar la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  1-4 alquil y aril- $\beta$ -D-glucósidos para liberar fracciones de aglicona fenólica (Rochín-Medina y col, 2015; Sánchez-Magaña y col, 2014). Cheng

y col (2013) reportaron que *R. oligosporus* tiene potencial para mejorar significativamente el contenido de actividad fenólica; ellos descubrieron que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa aumentaba con el tiempo de fermentación y daba como resultado la acumulación de agliconas fenólicas.

Para el caso de isoflavonas la única isoflavona identificada fue Genistina [Genisteína7-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1- $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosido] un tipo de Genisteína glicosilada, la cual solo fue identificada en los cotiledones de frijol negro Jamapa. Esta isoflavona aumentó (+330.83%) interesantemente durante el bioprocesamiento por FES de los cotiledones de esta variedad de frijol. En literatura se reporta que la principal leguminosa que contiene elevados niveles de isoflavonas es la soya. Varios autores han reportado que los contenidos de isoflavonas en la soya, sufren cambios importantes durante el proceso de fermentación, y que estos cambios dependen de las condiciones del proceso de fermentación (Dueñas y col, 2012). Dueñas y col (2012) observaron un aumento en la concentración total del contenido de isoflavonas en las muestras de soya fermentadas. Ellos resaltaron el aumento del contenido de agliconas de isoflavonas, como daidzeína, genisteína y gliciteína, en todas las muestras de soya después del proceso de fermentación. Estos investigadores también reportaron que este aumento en el contenido de agliconas después del proceso de fermentación podría asociarse a la disminución de los glucósidos de isoflavonas por la actividad glicosidasa inherente a los microorganismos utilizados para llevar a cabo la fermentación. Sin embargo, en la presente investigación este fenómeno de deglicosilación de isoflavonas no ocurrió, ya que fue el propio glicósido de genisteína el que incrementó después de la **FES** del frijol negro Jamapa. Más bien

su incremento podría estar relacionado con la liberación de este tipo de compuestos por acción de las amilasas producidas por el hongo, como fue reportado arriba.

#### **D. EFECTO DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE FES SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FITOQUÍMICOS HIDRÓFILICOS DE FRIJOL COMÚN**

Actualmente se emplean más de 20 diferentes ensayos para la actividad antioxidante con diversos mecanismos. Es muy difícil comparar los resultados obtenidos de diferentes métodos de ensayo debido a la diversidad en sustratos, condiciones de reacción y resultados presentados con diferentes unidades (Sreeramulu y col 2013). Además, la especificidad y sensibilidad de un método no permite la completa examinación de todos los compuestos antioxidantes en el extracto. Debido a lo anterior, la combinación de distintos métodos provee información más confiable de la actividad antioxidante de las diferentes muestras. En esta investigación se emplearon los tres métodos más comunes (ABTS, DPPH y ORAC) para determinar las propiedades antioxidantes en los extractos fenólicos obtenidos a partir de harinas de frijol común.

##### **1. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común**

En el **Cuadro 16** se presenta los valores de actividad antioxidante evaluada en extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las

variedades azufrado higuera y negro Jamapa. Los resultados indican que la harina de frijol sin procesar de la variedad negro Jamapa presentó un mayor valor de actividad antioxidante, cuando ésta fue evaluada por los tres métodos empleados en la presente investigación. Para el ensayo de ABTS en frijol común azufrado higuera, la harina de frijol sin procesar obtuvo valores de 617.3  $\mu\text{mol ET}/100$  (bs), este resultado concuerda con lo reportado por Guzmán-Uriarte y col (2013) para la fracción libre del grano azufrado Higuera crudo. Los valores de ABTS para frijol negro Jamapa fueron de 796.9  $\mu\text{mol ET}/100$ , bs. Resultados semejantes reportados por Grajales-García y col (2011). Los resultados de actividad antioxidante para harinas de frijol sin procesar empleando el ensayo DPPH para frijol azufrado higuera fue de 68.87 y 193.84  $\mu\text{mol ET}/100$  (bs), para las variedades azufrado higuera y negro Jamapa, respectivamente. Los resultados de actividad antioxidante para estas mismas muestras empleando el ensayo ORAC, mostraron que la frijol azufrado higuera tuvo un valor de 2801.25  $\mu\text{mol ET}/100$  (bs), y la variedad negro Jamapa un valor de 2914.14  $\mu\text{mol ET}/100$  (bs). Guzmán-Uriarte y col (2013) reportaron valores de ORAC para extractos fenólicos de grano crudo de la variedad azufrado higuera de 2,018  $\mu\text{mol ET}/100$  g (bs), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

**Cuadro 16.** Actividad antioxidante de extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido.

Frijol	Muestra	ABTS <sup>1</sup>	DPPH <sup>2</sup>	ORAC <sup>3</sup>
--------	---------	-------------------	-------------------	-------------------

Azufrado	<b>HFSP</b> <sup>4</sup>	617.36 ± 5.47 <sup>c</sup>	68.87 ± 1.48 <sup>f</sup>	2801.25 ± 67.06 <sup>b</sup>
Higuera	<b>HFRC</b> <sup>5</sup>	534.43 ± 4.89 <sup>d</sup>	84.42 ± 1.95 <sup>e</sup>	2888.06 ± 2.13 <sup>a</sup>
	<b>HCC</b> <sup>6</sup>	361.58 ± 817 <sup>e</sup>	54.33 ± 2.12 <sup>g</sup>	2073.71 ± 3.70 <sup>d</sup>
	<b>HT</b> <sup>7</sup>	172.85 ± 3.28 <sup>f</sup>	30.09 ± 0.40 <sup>h</sup>	814.34 ± 1.60 <sup>g</sup>
Negro	<b>HFSP</b> <sup>4</sup>	796.91 ± 52.86 <sup>b</sup>	193.84 ± 1.23 <sup>b</sup>	2914.14 ± 40.24 <sup>a</sup>
Jamapa	<b>HFRC</b> <sup>5</sup>	989.34 ± 44.68 <sup>a</sup>	287.77 ± 3.12 <sup>a</sup>	2300.38 ± 32.48 <sup>c</sup>
	<b>HCC</b> <sup>6</sup>	410.55 ± 16.45 <sup>e</sup>	166.19 ± 3.28 <sup>c</sup>	1304.63 ± 25.17 <sup>e</sup>
	<b>HT</b> <sup>7</sup>	578.78 ± 44.28 <sup>cd</sup>	121.58 ± 0.24 <sup>d</sup>	995.75 ± 21.88 <sup>f</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ ); <sup>1, 2, 3</sup>  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET)/100g (bs) <sup>4</sup> Harina de frijol sin procesar <sup>5</sup> Harina de frijol remojado-cocido <sup>6</sup> Harina de cotiledón cocido <sup>7</sup> Harina de testa

Iniestra-González y col (2005) estudiaron la capacidad antioxidante de 16 variedades de frijoles mexicanos caracterizados por diferentes tipos de granos: negro, pinto, crema o bayo, azufrado, Flor de mayo y blanco. Ellos reportaron que el "Flor de Mayo M38" y el "Negro Durango" mostraron la mayor capacidad antioxidante. Estos autores concluyeron que el frijol con testa de color negro y bayo se distinguen por la

actividad antioxidante más alta, mientras que "azufrado" mostró los niveles más bajos. El frijol común tiene capacidad antioxidante debido a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, como los que fueron discutidos en la sección anterior, para las variedades azufrado higuera y negro Jamapa. Dependiendo del tipo de los diferentes compuestos mencionados que estén presentes en el frijol serán sus propiedades antioxidantes. La capacidad antioxidante del frijol se debe principalmente a la capacidad reductora de los polifenoles, ya que juegan un papel muy importante durante la neutralización o eliminación de radicales libres, así como la quelación de los metales de transición, lo que perjudica tanto la iniciación como la propagación de los procesos oxidativos. Los intermedios formados como consecuencia de la actividad antioxidante fenólica son relativamente estables debido a la resonancia dentro de los anillos aromáticos contenidos en sus estructuras (Chávez-Mendoza y col, 2017). Algunos estudios afirman que la estructura de actividad antioxidante del flavonoide y del ácido fenólico depende de la posición fenólica del grupo hidroxilo y de la existencia de otros grupos funcionales en la molécula completa como el doble enlace y su conjugación con los grupos hidroxilo y cetona (Mishra y col, 2010). La capacidad de los flavonoides para formar complejos con iones metálicos juega un papel importante en su actividad antioxidante. Existe una relación específica entre las estructuras de flavonoides y su actividad antioxidante a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo en el núcleo de flavonoides, mayor es la actividad antioxidante (Cao y col, 1997). En el frijol, los flavonoides como la quercetina están glicosilados en la posición 3, lo que reduce enormemente su capacidad de acomplejación de metales, ya que la quelación del

grupo 3-hidroxi-4-ceto es el grupo complejante de metal más fuerte. El atributo estructural más imperativo para la actividad antioxidante es la orientación ortho 3', 4'-dihidroxi del anillo B. El kaempferol 3-O-glucósido no mostró actividad antioxidante con una única sustitución de B-4-hidroxilo, mientras que si se observó actividad antioxidante en kaempferol 3-O--glucósido con el método DPPH (Hayat y col, 2013).

En cuanto al efecto que tuvieron los procesos de remojo y cocción podemos observar que los resultados de las pruebas antioxidantes ABTS, DPPH y ORAC mostraron tendencia contradictoria, ya que mientras en un método aumentó la actividad antioxidante en otro método disminuyó para la misma muestra analizada. Algunos autores han reportado una actividad antioxidante en variedades del frijol común mexicano y han señalado algunos de los factores que contribuyen a esta variable como el procesamiento térmico y la variedad. Huber y col (2016) observaron diferencias entre los métodos ABTS y DPPH cuando evaluaron actividad antioxidante de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) color café antes y después del proceso de cocción, con y sin remojo. Cuando emplearon el método DPPH, ambos procesos de cocción dieron como resultado una mayor actividad antioxidante en el frijol cocido en comparación con los extractos del frijol crudo. Resultados similares fueron reportados por Rocha-Guzmán y col (2007), quienes concluyeron que el frijol cocido atrapo radicales libres a un ritmo mayor en comparación que el frijol crudo. El en el potencial antioxidante por el tratamiento térmico con o sin remojo puede ser debido a la concentración de compuestos fenólicos en el licor de cocción, lo que facilita su extracción (Huber y col, 2016). En el trabajo de Xu y Chang (2008), la capacidad de los compuestos para eliminar radicales libres, medida por DPPH, se redujo en un 28-

36% en granos cocidos bajo presión en comparación con los granos crudos y se redujo en un 23-31% en comparación con el frijol que se remojó antes de cocer. Estos autores atribuyeron esta disminución en la actividad antioxidante por el tratamiento térmico a diferentes posibilidades, como transformaciones químicas, descomposición de compuestos fenólicos, formación de complejos entre polifenoles y proteínas y solubilización de antioxidantes solubles en agua en el agua remojada desechada. En un estudio comparativo de las metodologías FRAP, ORAC, DPPH y ABTS realizado por Fernández-Panchon y col (2008) indicaron que, aunque los métodos ABTS y DPPH evalúan compuestos antioxidantes que tienen la capacidad de donar hidrógeno, la sensibilidad de estos compuestos por los radicales ABTS fue menor en comparación con el radical DPPH después del procesamiento térmico. Algunas de las explicaciones mencionadas arriba podrían ser las causas de este comportamiento irregular en la actividad antioxidante de las variedades de frijol estudiadas por efecto del remojo y cocción de los granos. Adicionalmente, se puede decir que la compleja variación de compuestos fenólicos en los materiales estudiados durante estas etapas de cocción y remojo, lo cual fue discutido en una sección anterior, podría explicar de alguna manera el comportamiento irregular de la actividad antioxidante evaluada por los métodos ABTS, DPPH y ORAC durante estos procesos. Además, estos cambios en el contenido de compuestos fenólicos durante estas etapas previas a la FES podrían provocar efectos sinérgicos y / o antagonistas dependiendo del tipo de compuestos retenidos.

## 2. Efecto de la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común

En el **Cuadro 17** se presenta los valores de actividad antioxidante evaluada en extractos fenólicos de harinas de cotiledones cocidos de frijol común sin fermentar y bioprocesados por **FES** (**HCC** y **HCF**, respectivamente) de las variedades azufrado higuera y negro Jamapa. Los resultados indican que los cotiledones bioprocesados por FES de ambas variedades de frijol presentaron valores sustancialmente más altos de actividad antioxidante que los cotiledones cocidos sin fermentar. Sin embargo, este aumento de la capacidad en los cotiledones de frijol común dependió del método empleado para evaluar la actividad antioxidante y de la variedad estudiada. Los aumentos de actividad antioxidante variaron entre 30 y 435%, dependiendo del método de evaluación y la variedad. Este aumento de la actividad antioxidante en frijol por efecto de la **FES** ha sido ampliamente documentado en la literatura, y en la mayoría de estos estudios se ha concluido que este aumento en actividad antioxidante se debe al aumento de compuestos fenólicos por efecto del bioproceso (Guzmán-Uriarte y col, 2013; Rochín-Medina y col, 2015), lo cual fue discutido ampliamente en una sección anterior. Diversos autores también han reportado el incremento en contenido de fenólicos y actividad antioxidante después de la fermentación con diferentes inóculos en diversos granos. Bhanja y Kuhad (2014) realizaron **FES** con 4 hongos filamentosos (*Aspergillus orizae*, *Aspergillus awamori*, *R. oligosporus* y *R. orizae*) en trigo, maíz,

**Cuadro 17.** Actividad antioxidante de extractos fenólicos de harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por **FES**

Frijol	Muestra	ABTS <sup>1</sup>	DPPH <sup>2</sup>	ORAC <sup>3</sup>
Azufrado	HCC <sup>4</sup>	389.46 ± 8.80 <sup>c</sup>	58.52 ± 2.28 <sup>d</sup>	2233.64 ± 3.98 <sup>b</sup>
Higuera	HCF <sup>5</sup>	1837.05 ± 40.34 <sup>b</sup>	132.75 ± 1.20 <sup>c</sup>	5795.18 ± 174.28 <sup>a</sup>
Negro	HCC <sup>4</sup>	457.03 ± 18.32 <sup>c</sup>	185 ± 3.65 <sup>b</sup>	1452.33 ± 28.02 <sup>c</sup>
Jamapa	HCF <sup>5</sup>	2445.08 ± 80.56 <sup>a</sup>	240.28 ± 5.26 <sup>a</sup>	5869.66 ± 396.21 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ ); <sup>1, 2, 3</sup>  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET)/100g (bs) <sup>4</sup> Harina de cotiledón cocido, <sup>5</sup> Harina de cotiledón fermentado <sup>4</sup> Harina de frijol sin procesar <sup>5</sup> Harina de frijol remojado-cocido <sup>6</sup> Harina de cotiledón cocido <sup>7</sup> Harina de testa

arroz y avena, reportando un incremento en actividad antioxidante por ABTS y DPPH después de la **FES**, relacionando este incremento con la liberación de compuestos bioactivos más solubles debido a la acción de enzimas producidas por los microorganismos. Niveditha y Sridhar (2014) analizaron la actividad antioxidante de dos variedades de frijol *Canavalia* después de la **FES** con *R. oligosporus*, reportando una elevación significativa en la actividad antioxidante, adjudicando este aumento al incremento en la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa capaz de liberar compuestos fenólicos glucosilados y permitiendo la liberación de agliconas durante la **FES**. Sin embargo, se ha reportado que distintas enzimas hidrolíticas producidas durante la **FES** están asociadas con la liberación de compuestos fenólicos (Robledo y col 2008; Cho y col 2009). Los resultados en el perfil de compuestos fenólicos obtenido después de la **FES** de los cotiledones de las variedades de frijol estudiadas en este trabajo, descrito y discutido ampliamente en la sección anterior, mostraron un incremento de agliconas de kaempferol y miricetina. Se ha visto que los flavonoides que tienen un mayor número de grupos hidroxilo presentan mayor actividad antioxidante. Sin embargo, la presencia de glucosilaciones en la molécula disminuye las propiedades antioxidantes de estos compuestos, y por lo tanto su mayor potencial se observa en las agliconas (Kumar y Pandey 2013). Tabart y col (2009) analizaron la actividad antioxidante medida por 3 métodos: En el ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), kaempferol mostró la misma actividad que el trolox, mientras que quercetina y miricetina mostraron mayor actividad que trolox; en el ensayo DPPH, kaempferol obtuvo la misma actividad que trolox, mientras que miricetina fue dos veces mayor que trolox y kaempferol-3-O-glucósido no obtuvo

actividad significativa por estos métodos. Sin embargo, en el ensayo de ORAC todos los flavonoides fueron de 4 a 6 veces mayores que trolox, además que en este ensayo el flavonoide kaempferol-O-glucósido obtuvo fuerte actividad antioxidante. Por lo que se destaca la importancia de utilizar más de un método para medir la actividad antioxidante. Sin embargo, existió una compleja variación de compuestos fenólicos en los materiales estudiados durante el bioprocesamiento por FES, lo cual fue discutido en una sección anterior, y podría explicar de alguna manera el comportamiento irregular de la actividad antioxidante evaluada por los métodos ABTS, DPPH y ORAC durante estos procesos. La sensibilidad de los compuestos fenólicos por los radicales empleados en los métodos ABTS, DPPH y ORAC es muy variada. Dueñas y col (2012) reportaron que esta gran variación de compuestos fenólicos durante la **FES** podría explicarse por el complejo metabolismo bioquímico de las semillas durante el tratamiento. Además, la activación de las enzimas endógenas en las semillas, junto con las enzimas producidas por cada microorganismo utilizado en el proceso de fermentación, podría provocar efectos sinérgicos y / o antagonistas dependiendo del tipo de compuestos analizado.

## **E. EFECTO DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE FES SOBRE LA POTENCIAL HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE FRIJOL COMÚN**

### **1. Efecto de las etapas previas (remojo-cocción) a la FES sobre la actividad antioxidante de extractos fenólicos de frijol común**

En el **Cuadro 18** se presenta los valores de actividad hipoglucemiante evaluada en extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido, de las variedades azufrado higuera y negro Jamapa. Los resultados se expresan como % Inhibición  $\alpha$ -amilasa o  $\alpha$ -glucosidasa y  $\mu\text{g}$  Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs). En el **Cuadro 18** se puede observar que la variedad de frijol negro Jamapa presentó un mayor potencial inhibitorio de la actividad de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Aunque en esta investigación no se analizó el perfil de antocianinas en frijol negro Jamapa, se sabe que los frijoles de testas coloreadas presentan estos compuestos (Aparicio-Fernández y col, 2005). Las antocianinas pueden actuar como inhibidores de alfa-glucosidasa debido a la similitud estructural entre sus sustratos y los azúcares que se unen a las antocianinas a través del enlace  $\beta$ -glucosídico (López-Martínez y col 2011). Teniendo en cuenta que la acción antidiabética de los extractos se ha asociado con frecuencia a la acción antioxidante de los mismos, muchos autores reportan que existe una fuerte correlación entre los antioxidantes y los inhibidores de tanto  $\alpha$ -glucosidasas como  $\alpha$ -amilasa (Kwon y col 2008; Galvez y col 2010). De este modo, la presencia de compuestos fenólicos o flavonoides pueden relacionarse con la inhibición de ambas enzimas (Oboh y col 2012). Se ha reportado

que los extractos con presencia de polifenoles con capacidad antioxidante y presencia de favonoides como quercetina

**Cuadro 18.** Actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de harinas de frijol común sin procesar y remojado-cocido

Frijol	Muestra	%IAA <sup>1</sup>	EAAA <sup>2</sup>	%IAG <sup>3</sup>	EAAG <sup>4</sup>
Azufrado Higuera	HFSP <sup>5</sup>	61.30 <sup>b</sup>	10.52 <sup>b</sup>	51.28 <sup>b</sup>	1627.07 <sup>b</sup>
	HFRC <sup>6</sup>	38.67 <sup>e</sup>	5.05 <sup>d</sup>	33.38 <sup>b</sup>	896.98 <sup>d</sup>
	HCC <sup>7</sup>	36.66 <sup>e</sup>	4.82 <sup>d</sup>	31.63 <sup>b</sup>	853.81 <sup>d</sup>
	HT <sup>8</sup>	2.00 <sup>f</sup>	0.23 <sup>e</sup>	1.75 <sup>d</sup>	43.17 <sup>e</sup>
Negro Jamapa	HFSP <sup>5</sup>	68.49 <sup>a</sup>	13.27 <sup>a</sup>	60.96 <sup>a</sup>	2191.17 <sup>a</sup>
	HFRC <sup>6</sup>	55.68 <sup>c</sup>	8.77 <sup>c</sup>	45.95 <sup>c</sup>	1378.97 <sup>c</sup>
	HCC <sup>7</sup>	50.266 <sup>d</sup>	7.96 <sup>c</sup>	43.06 <sup>c</sup>	1306.37 <sup>c</sup>
	HT <sup>8</sup>	5.42 <sup>f</sup>	0.80 <sup>e</sup>	2.88 <sup>d</sup>	72.59 <sup>e</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ ); <sup>1</sup> % de inhibición de  $\alpha$ -amilasa; <sup>2</sup>  $\mu\text{g}$ /Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs); <sup>3</sup> % Inhibición  $\alpha$ -glucosidasa, <sup>4</sup>  $\mu\text{g}$ /Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs), <sup>5</sup> Harina de frijol sin procesar <sup>6</sup> Harina de frijol remojado-cocido <sup>7</sup> Harina de cotiledón cocido <sup>8</sup> Harina de testa

y kaempferol, es un extracto promisorio para la inhibición de estas enzimas. Pinto y col (2009) analizaron diferentes extractos de frutos y reportaron que no siempre se encuentra relación entre la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria de alfa-glucosidasas.

Los resultados indican que los extractos fenólicos de las harinas de frijol sin procesar de las variedades azufrado higuera y negro Jamapa presentaron un mayor potencial inhibitorio de la actividad de  $\alpha$ -amilasa o  $\alpha$ -glucosidasa (mayor actividad hipoglucemiante), que la harina de los granos remojados-cocidos. Esta disminución puede ser explicada por la disminución de compuestos fenólicos con actividad inhibitoria de estas enzimas. Como se mencionó anteriormente para la actividad antioxidante, algunos compuestos capaces de inhibir a estas enzimas pudieron lixiviarse en el agua de remojo y de cocción.

## **2. Efecto de la FES sobre la actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de frijol común**

En el **Cuadro 19** se presenta los valores de actividad hipoglucemiante evaluada en extractos fenólicos de harinas de cotiledones de frijol común sin procesar y bioprocadas por **FES**, de las variedades azufrado higuera y negro Jamapa. Los resultados se expresan como % Inhibición  $\alpha$ -amilasa o  $\alpha$ -glucosidasa y  $\mu\text{g}$  Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs). Los resultados indican que los cotiledones

bioprocesados por **FES** de ambas variedades de frijol presentaron valores sustancialmente más altos de actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa que los cotiledones cocidos sin fermentar. Este aumento de la actividad

**Cuadro 19.** Actividad hipoglucemiante de extractos fenólicos de harinas de cotiledón cocido de frijol común sin fermentar y bioprocesado por **FES**

Frijol	Muestra	%IAA <sup>1</sup>	EAAA <sup>2</sup>	%IAG <sup>1</sup>	EAAG <sup>2</sup>
Azufrado	HCC	39.49 <sup>c</sup>	5.196 <sup>c</sup>	30.63 <sup>c</sup>	919.66 <sup>d</sup>
Higuera	HCF	75.48 <sup>a</sup>	16.81 <sup>a</sup>	64.56 <sup>a</sup>	2406.98 <sup>b</sup>
Negro	HCC	55.95 <sup>c</sup>	8.86 <sup>b</sup>	47.94 <sup>b</sup>	1454.27 <sup>c</sup>
Jamapa	HCF	76.76 <sup>b</sup>	17.54 <sup>a</sup>	71.06 <sup>a</sup>	3027.41 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes (Duncan;  $p \leq 0.05$ ); <sup>1</sup> % de inhibición de  $\alpha$ -amilasa; <sup>2</sup>  $\mu\text{g}$ /Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs); <sup>3</sup> % Inhibición  $\alpha$ -glucosidasa, <sup>4</sup>  $\mu\text{g}$ /Equivalentes de Acarbosa (EA)/100g (bs).

hipoglucemiante en frijol por efecto de la FES se debe al aumento de compuestos fenólicos por efecto del bioproceso (Sánchez-Magaña y col, 2014), lo cual fue discutido ampliamente en una sección anterior.

Los cambios observados en actividad antioxidante e hipoglucemiante en las diferentes harinas de frijol común pueden ser atribuidos a combinaciones sinérgicas o interacción de diferentes reacciones químicas, a la lixiviación de compuestos solubles en agua, y las modificaciones efectuadas por el proceso de FES.

## X. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 14 compuestos fenólicos pertenecientes a los grupos de ácidos hidroxicinámicos (derivados aldáricos de ácido ferúlico y ácido p-cumarico), flavanoles (catequina, procianidinas), flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina y sus formas glucosiladas) e isoflavonas (genisteína glicosilada) en extractos de fitoquímicos hidrófilicos de harinas de frijol común crudo y de las diferentes etapas del proceso de FES, en las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa.

2. En general, las etapas de acondicionamiento del grano (remojo y cocción), aplicadas antes de la FES, disminuyeron significativamente los niveles de compuestos fenólicos totales y fenólicos individuales como ácidos hidroxicinámicos y genisteína glicosilada, así como, aumentaron el contenido de flavonoles y el potencial inhibitorio de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa en ambas variedades de frijol, mientras que los favanoles aumentaron en la variedad azufrado higuera y disminuyeron en la variedad negro Jamapa.

3. El bioprocesamiento por FES modificó el perfil y el contenido de compuestos fenólicos hidrófilicos en ambas variedades del frijol común. La FES incrementó principalmente los derivados aldáricos de ácidos hidroxicinámicos, y disminuyó el contenido total de flavonoles en las dos variedades de frijol. La FES también incrementó el contenido de catequinas y procianidinas oligoméricas en la variedad Azufrado Higuera, mientras que en la variedad Negro Jamapa estos compuestos

disminuyeron, exceptuando la catequina conjugada. Destaca el aumento de agliconas de kaempferol y miricetina en las variedades de frijol Azufrado Higuera y Negro Jamapa, respectivamente, así como el aumento de Genisteína glicosilada en el frijol Negro Jamapa durante la FES.

4. La actividad antioxidante aumentó significativamente [372-435% (ABTS), 30-127% (DPPH) y 159-304% (ORAC)] en ambas variedades de frijol común por efecto del bioproceso de FES.

5. La FES incrementó significativamente el potencial hipoglucémico, expresado como un aumento de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, en ambas variedades de frijol común.

6. Esta investigación demostró que la FES es un bioproceso eficiente para la mejora del perfil y niveles de compuestos fenólicos asociados con el aumento del potencial antioxidante e hipoglucemiante de frijol común.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Reidah, IM, Arráez-Román D, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, y Fernández-Gutiérrez A. 2013. Phytochemical Characterisation of Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by Using High-performance Liquid Chromatography Coupled with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis* 24(2), 105-116.
- Afify AEMM, El-Beltagi HS, El-Salam SMA y Omran AA. 2012. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E,  $\beta$ -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3): 203-209.
- Aguilera Y, Estrella I, Benitez V, Esteban RM, y Martín-Cabrejas MA. 2011. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International* 44(3), 774-780.
- Akillioglu GH, Karakaya S. 2010. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Science and Biotechnology* 19(3): 633-639.
- Amarowicz R, y Pegg RB. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 865-878.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(17):7915-7922.

- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, López-Valenzuela JA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food chemistry* 106(1):106-112.
- AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis*. 16 Edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC, EUA.
- Aparicio-Fernandez X, Yousef GG, Loarca-Pina G, de Mejía E, Lila MA. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 53(11):4615-4622.
- Aparicio-Fernández X, Reynoso-Camacho R, Castaño-Tostado E, García-Gasca T, González de Mejía E, Guzmán-Maldonado SH, Elizondo G, Yousef GG, Lila MA, Loarca-Pina G. 2008. Antiradical capacity y induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract *Plant Foods for Human Nutrition*. 63:35–40.
- Arias C. 1993. *Manual de manejo post cosecha de granos a nivel rural*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S01.htm>
- Ariza-Ortega T, Zenón-Brione EY, Castrejón-Flores JL, Yáñez-Fernández J, Gómez-Gómez Y, Oliver-Salvador M. 2014. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology* 239(5): 785-794.

- Atchibri AOA, Brou KD, Kouakou TH, Kouadio YJ, y Gnakri D. 2010. Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(17): 1757-1761.
- Audu SS, y Aremu MO. 2011. Effect of processing on chemical composition of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Pakistan journal of Nutrition* 10(11): 1069-1075.
- Azad MB, Chen Y, y Gibson SB. 2009. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & redox signaling* 11(4): 777-790.
- Balderas Rentería, I. (2015). *Diabetes, Obesidad y Síndrome metabólico, un abordaje multidisciplinario*. México
- Barrett ML, Udani JK. 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition journal* 10(1):1.
- Barrios-González J. 2012. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47(2): 175-185.
- Barshes NR, Sigiredd, M, Wrobel JS, Mahankali A, Robbin, JM, Kougias P, y Armstrong DG. 2013. The system of care for the diabetic foot: objectives, outcomes, and opportunities. *Diabetic foot & ankle*, 4(1): 218
- Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical care medicine* 33(12):S498-S501.
- Bednar GE, Patil AR, Murray SM, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey GC. 2001. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal

digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *The Journal of nutrition* 131(2):276-286.

Beninger CW, Hosfield GL. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(27):7879-7883.

Bhanja T, y Kuhad RC. 2014. Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions. *Letters in applied microbiology* 59(5): 493-499.

Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H. 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The lancet* 361(9368):1496-1501.

Bobe G, Barrett KG, Mentor-Marcel RA, Saffiotti U, Young MR, Colburn NH, Albert PS, Bennink MR, Lanza E. 2008. Dietary cooked navy beans and their fractions attenuate colon carcinogenesis in azoxymethane-induced ob/ob mice. *Nutrition and cancer* 60(3):373-381.

Bouayed J, y Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3(4): 228-237.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28:25-30

- Bravo L, Siddhuraju P, Saura CF. 1998. Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content of Indian pulses. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(11):4667-4674.
- Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry* 13(8):444-461.
- Cabrera TC, Serrano DS. 2014. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular* 14(1).
- Calvo, F., López, M. J., Oyarzabal, M., & Rodríguez, M. 2006. Diabetes Mellitus tipo 1. Tratamiento. Seguimiento. Complicaciones agudas. Guías diagnóstico-terapéuticas en Endocrinología Pediátrica. Capítulo, 23.
- Campos-Vega R, Reynoso-Camacho R, Pedraza-Aboytes G, Acosta-Gallegos J, Guzman-Maldonado S, Paredes-Lopez O, Oomah B, Loarca-Piña G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food science* 74(7):T59-T65.
- Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Oomah BD. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International* 43(2):461-482.
- Cardador-Martinez A, Albores A, Bah M, Calderon-Salinas V, Castano-Tostado E, Guevara-Gonzalez R, Shimada-Miyasaka A, Loarca-Piña G. 2006. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from

common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 61(4):161-168.

Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G, Oomah BD. 2002. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 50(24):6975-6980.

Cencic A, Chingwaru W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2(6):611-625.

Cervantes-Villagrana RD, y Presno-Bernal JM. 2013. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 21(3), 98-106.

Chávez-Mendoza C. y Sánchez E. 2017. Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules* 22(8), 1360.

Cho KM, Hon, SY, Math RK, Lee JH, Kambiranda DM, Kim JM, y Yun HD. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1. *Food chemistry* 114(2), 413-419.

Crozier A, Jagannat, IB, y Clifford MN. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports* 26(8), 1001-1043.

Dai G, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D. 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology* 101(5):541-547.

- DeBusk R. 2009. Diet-related disease, nutritional genomics, and food and nutrition professionals. *Journal of the American dietetic association* 109(3), 410-413.
- De MejiBa EG, Ramos-Gómez M,Loarca-Pina G. 1997. Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B1 in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and molecular mutagenesis* 30:346-353.
- de Mejia EG, Castano-Tostado E, y Loarca-Pina G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 441(1), 1-9.
- Díaz-Batalla L, Widholm JM, Fahey GC, Castaño-Tostado E,Paredes-López O. 2006. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 54(6):2045-2052.
- Díaz AM, Caldas GV,Blair MW. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International* 43(2):595-601.
- Díaz-Camacho HB. 2010. Estudio morfométrico-fractal de la bioestructura de *Rhizopus oligosporus* durante su crecimiento [Tesis de Doctorado]. Ciudad de México: Instituto Politecnico Nacional. 124 p. Disponible en: [tesis.ipn.mx](http://tesis.ipn.mx)*

- Dinelli G, Bonetti A, Minelli M, Marotti I, Catizone P, y Mazzanti A. 2006. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food chemistry* 99(1), 105-114.
- Duenas M, Fernández D, Hernández T, Estrella I, y Muñoz R. 2005. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(2), 297-304.
- Dueñas M, Hernández T, Lamparski G, Estrella I, y Muñoz R. 2012. Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 62(4), 241-250.
- Dueñas M. Martínez-Villaluenga, C. Limón, R.. 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.

- Dueñas M, Sarmiento T, Aguilera Y, Benitez V, Mollá E, Esteba RM, y Martín-Cabrejas MA. 2016. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT-Food Science and Technology* 66, 72-78.
- Durackova Z. 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 59(4):459.
- Eduar Oy. 2015. Proceso de fermentación sólida con *rhizopus oligosporus* para la detoxificación de semillas de lupino (*Lupinus Mutabilis*) [Tesis de Doctorado]. Santiago de Calí, Colombia: Universidad del Valle. 132 p. Disponible en: [Univalle.edu.com](http://Univalle.edu.com)
- El Sohaimy S. 2012. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal* 20(5):691-708.
- Elejalde Guerra J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *SciELO Espana* 50-59
- [ENSANUT]. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Disponible en: [http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut\\_mc\\_2016-310oct.pdf](http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf)  
Consultado el 3 de septiembre del 2017
- Escorcía S. 2009. Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 17(3):120-128.
- Espinosa-Alonso L. G, Lygin A, Widholm JM, Valverde ME, y Paredes-Lopez O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 54(12), 4436-4444.

FAO. 1990. Protein Quality Evaluation: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

[FAOSTAT]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/> Consultado el 11 de agosto del 2017.

Fowler MJ. 2008. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes* 26(2), 77-82. Frassinetti S, Gabriele M, Caltavuturo L, Longo V, y Pucci L. 2015. Antimutagenic and antioxidant activity of a selected lectin-free common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in two cell-based models. *Plant foods for human nutrition* 70(1), 35-41.

Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of agricultural and food chemistry* 44(1):6-29.

Galvez RL, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101 4676–4689.

García-Alcalá H, Meaney-Mendiolea E, Vargas-Ayala G, Escalante-Pulido M, Aldrete-Velasco J. 2011. Revisión actual de los conocimientos sobre la absorción intestinal de carbohidratos y su relación con la prevención del riesgo cardiovascular. *Rev Medicina Interna México* 27(3):270-280.

- García-Salas P. 2016. Técnicas analíticas avanzadas para la determinación de compuestos bioactivos en muestras vegetales [Tesis de Doctorado]. Granada, España: Universidad de Granada. 463 p.
- Garibay MG, Ramírez RQ, Canales AL-M. 1993. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa.
- Grajales-García EM, Osorio-Díaz P, Goñi I, Hervert-Hernández D, Guzmán-Maldonado SH, y Bello-Pérez LA. 2011. Chemical composition, starch digestibility and antioxidant capacity of tortilla made with a blend of quality protein maize and black bean. *International journal of molecular sciences* 13(1), 286-301.
- Gómez-Favela MA, García-Armenta E, Reyes-Moreno C, Garzón-Tiznado JA, Perales-Sánchez JXK, Caro-Corrales JJ, y Gutiérrez-Dorado R. (2017). MODELLING OF WATER ABSORPTION IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L) SEEDS GROWN IN MEXICO S NORTHWEST. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16(1).
- González-Sánchez A, y Ortiz-Andrade R. 2012. ¿ Qué sabe usted acerca de... los antidiabéticos orales (ADO's)? *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(1), 79-84.
- Goñi I, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research* 17(3):427-437.
- Goodman BE. 2010. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in physiology education* 34(2), 44-53.
- Granfeldt Y, Bjorck I, Drews A, Tovar J. 1992. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to. *European Journal of Clinical Nutrition* 46:649-660.

- Guajardo-Flores D, García-Patiño M, Serna-Guerrero D, Gutiérrez-Urbe JA, y Serna-Saldívar SO. 2012. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food chemistry* 134(3), 1312-1319.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Muguerza B. 2012. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One* 7(11):e49493.
- Guevara-Gasca MDP, Galán-Cuevas S. 2010. El papel del estrés y el aprendizaje de las enfermedades crónicas: hipertensión arterial y diabetes. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual/Latin American Journal of Behavioral Medicine* 1(1):47-55.
- Guías, A. L. A. D. 2013. Sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en evidencia. *Revista de la ALAD*, 1-142.
- Guzmán Tovar I, Almanza Aguilera E, Acosta Gallegos JA, y Guzmán Maldonado SH. 2009. Estudio comparativo de características de calidad entre genotipos de frijol de grano negro. *Agricultura técnica en México* 35(4), 449-457.
- Guzmán-Uriarte ML, Sánchez-Magaña LM, Angulo-Meza GY, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Mora-Rochín S, Milán-Carrillo J, Valdez-Ortiz A, Reyes-Moreno C. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. *Food and Nutrition Sciences* 4(4):480.
- Habtemariam S. 2011. A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural product communications* 6(2):201-203.

- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8(9):950-988.
- Hasjim J, Jane JI. 2009. Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch. *Journal of Food science* 74(7):C556-C562.
- Hayat I, Ahmad A, Masud T, Ahmed A, y Bashir S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical reviews in food science and nutrition* 54(5), 580-592.
- Hernández-López VM, Vargas-Vázquez M, Luisa P, Muruaga-Martínez JS, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N. 2013. Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana* 36(2):95-104.
- Herrera-Chalé F, Betancur-Ancona D, Campos S, y Rubi M. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1) 10-20.
- Hou DX, Kai K, Li JJ, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, Fujii M, Young MR, Colburn N. 2004. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25(1):29-36.
- Huber K, Brigide P, Bretas EB, y Canniatti-Brazaca SG. 2016. Phenolic acid, flavonoids and antioxidant activity of common brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and after cooking. *Journal of nutrition and food science*. 6-5
- Hutkins RW. 2006. Microorganisms and metabolism. *Microbiology and technology of fermented foods*. Oxford, UK: Blackwell, 15-66.

[INEGI]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107> Consultado el 18 de agosto del 2017.

Iniestra-González JJ, Ibarra-Pérez FJ, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE, y González-Laredo RF. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia* 39(6).

Isla PP. 2012. Chronic complications of diabetes mellitus. Recommendations from the American Diabetes Association 2011. Prevention and management. *Revista de enfermería* 35(9):46-52.

Kumar S, y Pandey A. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013.

Kao C, Robinson R. 1978. Nutritional aspects of fermented foods from chickpea, horsebean, and soybean [Proteins, rats]. *Cereal Chemistry*. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19790365804>

Konya H, Katsuno T, Tsunoda T, Yano Y, Kamitani M, Miuchi M, Hamaguchi T, Miyagawa JI, Namba M. 2013. Effects of combination therapy with mitiglinide and voglibose on postprandial plasma glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 6:317.

Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. 2008. In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology* 99, 2981–2988.

- Leonard HP. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 40(3):20-28.
- Lin LZ, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food chemistry 107(1):399-410.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, y Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews 4(8), 118.
- Lonsane B, Ghildyal N, Budiartman S y Ramakrishna S. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 7(6): 258-265.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, y Carretero ME. 2013. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food chemistry 138(1), 547-555.
- López-Amorós ML, Hernández T, Estrella I, Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. Journal of food composition and analysis., 2006, 19, 277–283.
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho S P, Vega-Avina R, Ahumada-Santos YP, y Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species from Mexico. Arabian Journal of Chemistry.
- López-Martínez LX, Aguilar-Cisneros LM, y Dublán-García O. 2014. Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). Nova scientia 6(12), 234-347.

- Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C, Franconi MC. 2007. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Bioquímica y Patología Clínica* 71(1):54-66.
- Luthria DL, Pastor-Corrales MA. 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of food composition and analysis* 19(2):205-211.
- Maldonado SHG, Gallegos JAA, de los Ángeles Álvarez-Muñoz M, García-Delgado S, Piña GL. 2015. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 28(2):159-173.
- Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, Pedrosa MM, Cuadrado C, Hernández T, Díaz S, y Esteban RM. 2009. The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry* 114(3), 1063-1068.
- Martinez PAH, Naranjo FA, y Nugaray AJ. 2003. Antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos presentes en frijol negro Querétaro y Mayocoba y su estabilidad durante el cocimiento. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta Jalisco, Mexico (8-12).
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. 2000. [Nutritional importance of phenolic compounds in the diet]. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 50(1):5-18.
- Martínez Sánchez G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia* 39(3): 0-0.

- McCue PP, Horii A, Shetty K. 2004. Solid-state bioconversion of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Rhizopus oligosporus*: role of carbohydrate-cleaving enzymes. *Journal of food biochemistry* 27(6):501-514.
- McCue PP, y Shetty K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13(1).
- Mccue PP, Kwon y I, y Shetty K. 2005. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin i-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of food biochemistry* 29(3), 278-294.
- Mederos Y. 2013. Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 27(3):55-62.
- Mekky RH, del Mar Contreras M, El-Gindi MR, Abdel-Monem AR, Abdel-Sattar E, y Segura-Carretero A. 2015. Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *RSC Advances* 5(23), 17751-17767.
- Meza DLM, Medina R. 2015. Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química* 10(1):33-40.
- Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, Fraser GE. 1989. Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* 64(3):598-604.
- Ming-Yen J, Cheng-Chun C-. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food microbiology* 27(5):586-591.

- Mishra SB, Rao CV, Ojha, SK, Vijayakumar M, y Verma A. 2010. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1(1), 1647-52.
- Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review* 8:183-225.
- Mollinedo Patzi MA, Benavides Calderón GL. 2014. Carbohidratos. *Revista de Actualización Clínica Investiga* 41:2133.
- Montoya CA, Lallès JP, 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.
- Mujica MV, Granito M, y Soto N. 2012. Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. *Bioagro* 24(3).
- Nazarni R, Purnama D, Umar S, y Eni H. 2016. The effect of fermentation on total phenolic, flavonoid and tannin content and its relation to antibacterial activity in jaruk tigarun. *International Food Research Journal*, 23(1).
- Nijpels G, Boorsma, Dekker JM, Kostense PJ, Bouter LM, y Heine RJ. 2008. A study of the effects of acarbose on glucose metabolism in patients predisposed to developing diabetes: the Dutch acarbose intervention study in persons with impaired glucose tolerance (DAISI). *Diabetes/metabolism research and reviews* 24(8), 611-616.

- Niveditha VR, y Sridhar KR. 2014. Antioxidant activity of raw, cooked and *Rhizopus oligosporus* fermented beans of *Canavalia* of coastal sand dunes of Southwest India. *Journal of food science and technology* 51(11), 3253-3260.
- Nout M, Rombouts F. 1990. Recent developments in tempe research. *Journal of Applied Bacteriology* 69(5):609-633.
- Nout MJR y Kiers JL. 2005. Tempe fermentation innovation and functionality: up-date into the 3er millennium. *Journal of Applied Microbiology* 98(4):789-805.
- Nyau V, Prakash S, Rodrigues J, y Farrant J. 2016. Screening Different Zambian Market Classes of Common Beans (*Phaseolus vulgaris*) for Antioxidant Properties and Total Phenolic Profiles. *Journal of Food and Nutrition* 4(4), 230-236.
- Oboh G, Ademiluyi AO, Akinyemi AJ, Henle T, Saliu JA, y Schwarzenbolz U. 2012. Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) in vitro. *Journal of Functional Foods* 4(2), 450-458.
- [OMS]. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: [http://www.who.int/topics/chronic\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/) Consultado el 13 febrero del 2016.
- Othman N B, Roblain D, Chammen N, Thonart P, y Hamdi M. 2009. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry* 116(3), 662-669.
- Oomah BD, Corbé A, y Balasubramanian P. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(14), 8225-8230.

- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4619–4626.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process biochemistry* 35(10):1153-1169.
- Paredes-López O, Harry G. 1989. Changes in selected chemical and antinutritional components during tempeh preparation using fresh and hardened common beans. *Journal of Food science* 54(4):968-970.
- Pari L, Venkateswaran S. 2003. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 58(12):916-919.
- Pérez-Herrera P, Esquivel-Esquivel G, Rosales-Serna R, y Acosta-Gallegos J.A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 52(2): 172-180.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2):89-96.
- Porrás-Loaiza, A.P y López-Malo, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.
- Posada M, Pineda V, Agudelo G. 2003. Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas. *Perspect Nutr Humana* 7:1-22.

- Prati S, Baravelli V, Fabbri D, Schwarzinger ., Brandolini V, Maietti A, y Bonetti A. 2007. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *Journal of separation science* 30(4), 491-501.
- Preuss HG. 2009. Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: effects on diabetes and general health . *Journal of the American College of Nutrition* , 28 : 266 – 276 .
- Prior RL, Wu X y Schaich K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53
- Quevedo HJM, Quintana M, Almares A,Hernández L. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de la *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 13:123-128.
- Quilantán P, Manuel L. 1996. Fermentación en estado sólido del mijo perla (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) por *Rhizopus oligosporus* para la obtención de un producto rico en proteína. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ramírez JCR, Rangel I. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente* 3(8).
- Ramírez-Jiménez AK, Reynoso-Camacho R, Tejero ME, León-Galván F, y Loarca-Piña G. 2015. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International* 76:92-104.
- Ray PD, Huang BW, y Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* 24(5), 981-990.

- Raikos V. 2010. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids* 24(4), 259-265.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26(9), 1231-1237.
- Reddy N, Pierson M, Sathe S, Salunkhe D. 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates—a review. *Food chemistry* 13(1):25-68.
- Rey MR, Gutiérrez JÁ, Lucas EG, y García JL. 2012. Manejo terapéutico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Antidiabéticos orales. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 11(18), 1073-1081.
- Reyes-Bastidas M, Reyes-Fernández EZ, López-Cervantes J, Milán-Carrillo J, Loarca-Piña GF, Reyes-Moreno C. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food science and technology international* 16(5):427-434.
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milan-Carrillo J, Gomez-Garza R. 2000. Composición química y calidad nutritiva de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) fresco y endurecido después de la fermentación en estado sólido (FES)/Chemical composition and nutritional quality of fresh and hardened chickpea (*Cicer arietinum* L) after the solid state fermentation (SSF). *Food science and technology international* 6(3):251-258.
- Reyes-Moreno C, Paredes-López O, Gonzalez E. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 33(3):227-286.

- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(10):2866-2887.
- Robledo A, Aguilera-Carbó A, Rodríguez R, Martínez JL, Garza Y, y Aguilar CN. 2008. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 35(6), 507-513.
- Rochín-Medina JJ, Gutiérrez-Dorado R, Sánchez-Magaña LM, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Mora-Rochín S, Valdez-Ortiz A, Reyes-Moreno C. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International journal of food sciences and nutrition* 66(5):498-504.
- Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* 30(1):15-20.
- Rodríguez-Rivera NS, Cuautle-Rodríguez P, Molina-Guarneros JA. 2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Revista del Hospital Juárez de México*, 84(4), 203-211.
- Romani A, Vignolini P, Galardi C, Mulinacci N, Benedettelli S, Heimler D. 2004. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(12):3838-3842.
- Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JÁ. 2013. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *salud pública de méxico* 55:S332-S340.

- Ross K, Beta T, Arntfield S. 2009. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food chemistry* 113(1):336-344.
- Roubos-van den HIL PJ, Schols HA, Rob Nout MJ, Zwietering MH y Gruppen H. 2010. First characterization of bioactive components in soybean tempe that protect human and animal intestinal cells against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13):7649–7656.
- Sadh PK, Saharan P, y Duhan JS. 2017. Bioaugmentation of phenolics and antioxidant activity of *Oryza sativa* by solid state fermentation using *Aspergillus* spp. *International Food Research Journal* 24(3).
- Salaverría-de Sanz GP, Suniaga - de Daza M, E, Velásquez E. 2012. Tratamiento con antihiperglucemiantes orales, clasificación, propiedades ,combinaciones, indicaciones, adversos, contraindicaciones y eventos. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo* 10(Supl 1):59.
- Sánchez-Magaña LM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Valdez-Ortiz A, Milán-Carrillo J,Reyes-Moreno C. 2014. Solid-state bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality. *International journal of food sciences and nutrition* 65(5):558-564.
- Schipper MA. 1984. Revision of the genus *Rhizopus*. *Stud. Mycol.* 25:1-34.

- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, y Torres-Torres M. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics* 46(7): 707-713.
- Serrano MED, López ML, Espuñes TDRS. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(4):58-68.
- Shurtleff W, Aoyagi A. 2007. History of tempeh. Luettavissa: Soyinfo center. 989 p.
- [SIAP]. 2017. SERVICIO DE INFORMACION AGROALIMENTARIA PESQUERA. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>. Consultado el 3 enero del 2018
- Singleton VL, Orthofer R y Lamuele-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-165
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45(3):379-396.
- Sparringa R, Owens J. 1999. Protein utilization during soybean tempe fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry* 47(10):4375-4378.
- Sreerama YN, Sashikala VB, Pratape VM. 2010. Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(14), 8322-8330.
- Sreeramulu D, Reddy CVK, Chauhan A, Balakrishna N, y Raghunath M. 2013. Natural antioxidant activity of commonly consumed plant foods in India: effect of domestic processing. *Oxidative medicine and cellular longevity* (2013).

- Steinkraus K. 1995. Handbook of Indigenous Fermented Foods, revised and expanded. CRC Press.
- Steinkraus K, Hand D, Van Buren J, Hackler L. 1961. Pilot plant studies on tempeh. 75 p.
- Suárez López M, Kizlansky A, López LB. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición hospitalaria* 21(1):47-51.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, y Dommes J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113(4), 1226-1233.
- Tierno R, Hornero-Méndez D, Gallardo-Guerrero L, López-Pardo R, y de Galarreta, JIR. 2015. Effect of boiling on the total phenolic, anthocyanin and carotenoid concentrations of potato tubers from selected cultivars and introgressed breeding lines from native potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 41, 58-65.
- Thompson MD, Mensack MM, Jiang W, Zhu Z, Lewis MR, McGinley JN, Brick MA, Thompson HJ. 2012. Cell signaling pathways associated with a reduction in mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Carcinogenesis* 33(1):226-232.
- Tormo M, Gil-Exojo I, de Tejada AR, Campillo J. 2004. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British journal of nutrition* 92(05):785-790.
- Torre EM, Tejedor FJL, Menéndez SA, Núñez-Cortés JM, García AA, Domingo MP, Solans JRG, Guisasola FÁ, Alegría JG, Bravo JM. 2011. Recomendaciones para el

tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Atención Primaria 43(4):202. e201-202. e209.

Tundis R, Loizzo MR, y Menichini F. 2010. Natural products as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. Mini reviews in medicinal chemistry 10(4). 315-331.

Vargas FD, Gutiérrez CIF, Heredia JB, Rangel MDM, Godoy SM, Dorado RG, Moreno CR, Valdez-Ortiz A, Valenzuela JAL. Potencial nutracéutico de harinas precocidas de maíz y frijol obtenidas a partir de extrusión y fermentación en estado sólido.

Varghese GK, Bose LV, Habtemariam S. 2013. Antidiabetic components of Cassia alata leaves: identification through  $\alpha$ -glucosidase inhibition studies. Pharmaceutical biology 51(3):345-349.

Velasco-González O, San Martín-Martínez E, Aguilar-Méndez M, Pajarito-Ravelero A, Mora-Escobedo R. 2013. Propiedades físicas y químicas del grano de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Bioagro 25(3):161-166.

Venero Gutiérrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar 31(2):126-133.

Vermerris W y Nicholson R. (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. In Phenolic compound biochemistry 21(5):23.31

Vicedo Tomey A, Vicedo Ortega Y. 2000. Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 19(3):206-212.

- Wang HL, Swain EW, y Hesseltine CW. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *Journal of food science* 40, 168-170.
- Wani IA, Sogi DS, Wani AA, Gill BS, y Shivhare US. 2010. Physico-chemical properties of starches from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *International journal of food science & technology* 45(10), 2176-2185.
- Wijayanti ED, Setiawan NCE y Cristi JP. (2017). Effect of lactic acid fermentation on total phenolic content and antioxidant activity of fig fruit juice (*Ficus carica*). *Advances in health sciences research* (2)
- Wronkowska M, Christa K, Ciska E, y Soral-Śmietana M. 2015. Chemical characteristics and sensory evaluation of raw and roasted buckwheat groats fermented by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Food Quality* 38(2): 130-138.
- Xu B y Chang SK. 2008. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(18): 8365-8373.
- Xu B y Chang, SK. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(11), 4754-4764.

- Xu B y Chang SK. 2011. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. *Food chemistry* 129(3):974-981.
- Yeap SK, Mohd N, Mohd H, Alithen NB, Beh BK, Ho WY, Koh SP, Long K. 2012. Antihyperglycemic effects of fermented and nonfermented mung bean extracts on alloxan-induced-diabetic mice. *BioMed Research International*. (2012)
- Young IS, y Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 54(3), 176-186.
- Zhu XW, Deng FY, Wu LF, Tang ZX, Lei SF. 2015. Functional mechanisms for type 2 diabetes-associated genetic variants. *Journal of diabetes and its complications* 29(4):497-501.

## **ABREVIATURAS**

% Porcentaje

°C Grado (s) Celsius

$\alpha$  Alfa

AAE Aminoácidos esenciales

Aw Actividad de agua

ADN Ácido desoxirribonucleico

AAox Actividad antioxidante

AR Almidón resistente

AS Almidón soluble

$\beta$  Beta

Bs Base seca

C Carbono

Ca Calcio

CAAE Contenido de aminoácidos esenciales

Cm Centímetro

CO<sub>2</sub> Dióxido de carbono

C-PER Relación de eficiencia proteica calculada

Cu Cobre

DM	Diabetes Mellitus
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EtOH	Etanol
EROS	Especies reactivas del oxígeno
FAO	Organización para la alimentación y agricultura (del inglés, Food and Agriculture Organization)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FDT	Fibra Dietaria Total
Fe	Hierro
FES	Fermentación en Estado Sólido
FT	Temperatura de fermentación
Ft	Tiempo de fermentación
Flav	Flavonoides
CT	Fenólicos totales
G	Gramos
GRAS	Generally Recognized as Safe

H	Hora (s)
Ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
HFCB	Harina de frijol común bioprocesada
HTA	Hipertensión arterial
IAA	Índice de absorción en agua
IAAE	Índice de aminoácidos esenciales
IDF	Federación Internacional de Diabetes
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISA	Índice de solubilidad en agua
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
M	Molaridad
Mg	Miligramo
µg	Microgramo
Min	Minuto (s)

mL	Mililitro (s)
$\mu$ L	Microlitro (s)
Mg	Magnesio
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercurio
$\mu$ M	Micromolar
mM	Milimolar
N	Normal
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro (s)
NPR	Relación neta de proteína
NaOH	Hidróxido de sodio
NO $\cdot$	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> $\cdot^-$	Anión superóxido
OH $\cdot$	Ión hidroxilo

ONOO·	Peroxinitrito
P	Fósforo
<i>P</i>	<i>Phaseolus</i>
pH	Potencial de hidrógeno
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
Pág.	Página (s)
PER	Relación de eficiencia proteínica
pp.	Página (s)
<i>R</i>	<i>Rhizopus</i>
ROS	Capacidad antioxidante de radical oxígeno
ROO	Radicales peróxido
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Ton	Tonelada (s)
UV	Ultravioleta

v/v      Volumen/volumen

Zn      Zinc