



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Propiedades Antihipertensiva y Antimutagénica del
Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L)
Bioprocesado por Fermentación en Estado Sólido**

T E S I S

Que presenta

Melissa de Jesús Vega Burgueño

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

Dr. Roberto Gutiérrez Dorado

Dr. Luis Martín Sánchez Magaña

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2018

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y el laboratorio de Investigación 2 de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y el Dr. Luis Martín Sánchez Magaña y la asesoría del Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno, Dr. Francisco Delgado Vargas y el Dr. Francisco Cabrera Chávez. Melissa de Jesús Vega Burgueño recibió beca de posgrado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa, el día 08 del mes de febrero del año 2018, la que suscribe LN. Melissa de Jesús Vega Burgueño, alumna del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0717129-3, de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y Dr. Luis Martín Sánchez Magaña y cede los derechos del trabajo titulado “Propiedades Antihipertensiva y Antimutagénica del Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) Bioprocesado por Fermentación en Estado Sólido”, 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.

Melissa Vega B.

Nombre completo y firma

Melissa de Jesús Vega Burgueño

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, a través de la facultad de Ciencias Químico biológicas, por haberme aceptado en la **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, al igual que a todos los maestros que la conforman por todo el aprendizaje, las experiencias y exigencias a lo largo de estos dos años, no fue nada fácil volver a ser una estudiante y lo disfruté muchísimo. Asimismo, agradezco a mis compañeros de generación por los momentos compartidos.

Al **Dr. Roberto Gutiérrez** por aceptarme en su grupo de trabajo y poner en mis manos este proyecto de investigación. Agradezco su paciencia y todos los conocimientos aprendidos que sin duda han contribuido a mi desarrollo profesional, así como también al **Dr. Luis Martín Sánchez**, por guiarme de igual manera en este proyecto.

A la **Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía** y al **Dr. Francisco Cabrera**, por permitirme realizar el trabajo experimental en el bioterio del laboratorio de Investigación II, al igual que a **Giovanni, Paty, Gilberto, Jesús, Ricardo, Saúl y Cristina** por su compañerismo y por el apoyo brindado.

Al **Dr. Francisco Delgado** y su equipo de trabajo por el apoyo otorgado para la realización del trabajo experimental.

A mis compañeros del **Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales. Dra. Xiomara**, gracias por ser una pieza clave en la realización de este proyecto y por todo el apoyo brindado. **Daniel**, esta tesis no hubiera sido posible sin tu ayuda. Gracias por todos los conocimientos acerca del mundo de los experimentos *in vivo* y de cómo sobrevivir a una tesis de maestría. Gracias por no

solo ser un compañero de trabajo, sino también un amigo. **Fernando**, mafren gracias por ser el papá de los pollitos, por todo tu apoyo a lo largo de este recorrido. Espero que sepas lo valiosa que es para mí tu aportación a este logro académico. **Mario**, gracias por tu apoyo y por ayudarme a mantener la cordura en las últimas semanas de trabajo en el bioterio. A mis demás compañeros, **Celeste, Denisse, Yazmín, Luisa Fernanda, Demis y Martín** por hacer más agradable mi estadía en el laboratorio.

A mis amigas, **Malenny, Blanca y María Fernanda**. Sin dudarlo son lo mejor que me ha dado esta travesía, gracias por todo el apoyo, por las aventuras, los momentos compartidos y sobre todo por su amistad, las quiero muchísimo mafrens.

A mis padres **Oscar y Marlen**, por ser mis pilares, por su apoyo incondicional, por su amor y por siempre creer en mí. Espero poder regresarles todo lo que me han dado, los amo muchísimo. A mi hermano **Oscar Daniel**, al igual eres un pilar importante en mi vida, gracias por hacer mis días más divertidos, te adoro. A mis tías y primos **Macrina, Olga, Juan Pablo y Jesús Daniel**, por su apoyo y por siempre estar presentes en los momentos más importantes de mi vida. A la familia **Mendoza Liera**, mi familia, gracias por todo su apoyo y su cariño.

A mi amiga **Jenie**, porque me sigues guiando desde donde estés. Porque cada logro mío, también es tuyo. Te quiero carnalita.

Por último pero no menos importante, a mí esposo **Carlos**. Tu apoyo ha sido el más importante en este camino. Gracias por siempre alentarme a luchar

por lo que quiero, y por estar juntos de la mano en mis triunfos y tropiezos. Gracias por escucharme, por siempre estar dispuesto a ayudarme, por siempre sacarme una sonrisa, por tu amor, por tu paciencia, por todo. Tú, Yuya, Kona y nuestro bebé son el motor de mi vida, te amo muchísimo.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
A. Estrés oxidativo	8
1. Radicales libres.....	8
2. Daños por ERO a biomoléculas.....	9
a. Lípidos	9
b. Proteínas	9
c. Ácidos nucleicos	10
B. Enfermedades crónico degenerativas	10
1. Hipertensión.....	11
a. Generalidades	11
b. Fisiopatología	12
c. Estrategias para controlar la presión arterial.....	13
1) Medicamentos comercialmente disponibles	13
2) Fitoquímicos con propiedades antihipertensivas	14
2. Cáncer	15

a. Generalidades	15
b. Mutagénesis y carcinogénesis.....	16
C. Alimentos funcionales.....	18
1. Definición	18
2. Alimentos nutracéuticos	19
3. Compuestos antioxidantes.....	19
D. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	20
1. Origen	20
2. Producción	21
3. Estructura del grano de frijol	21
4. Composición química.....	24
a. Proteína	26
1) Calidad de la proteína.....	26
b. Hidratos de carbono.....	27
c. Almidón resistente.....	28
d. Fibra dietaria total	28
e. Lípidos	29
f. Vitaminas y minerales.....	30
5. Fitoquímicos del frijol	30
a. Compuestos fenólicos en el frijol	31

1) Ácidos fenólicos.....	33
2) Flavonoides	33
a) Antocianinas	34
b) Isoflavonas	34
3) Taninos.....	35
6. Factores antinutricionales del frijol común	36
7. Actividad antioxidante del frijol.....	38
8. Propiedades nutracéuticas de los fitoquímicos presentes en el frijol	39
a. Antihipertensiva	39
b. Antimutagénica.....	39
D. Fermentación en estado sólido (FES).....	40
1. Generalidades.....	40
2. Tempe.....	41
a. Características.....	41
b. Sustrato	42
c. Inóculo	42
3. Manufactura del tempe	43
a. Limpieza / remojo / descascarillado.....	45
b. Cocción parcial / drenado / enfriado	45
c. Inoculación.....	45

d. Contenedor de FES/Incubación	46
4. Cambios químicos durante la producción del tempe	46
a. Proteínas	46
b. Hidratos de carbono.....	47
c. Lípidos	47
d. Vitaminas y minerales.....	48
5. Efecto de la FES sobre el valor nutricional del sustrato.....	48
a. Valor biológico de las proteínas.....	48
b. Digestibilidad	48
c. Perfil de aminoácidos.....	50
6. Efecto de la FES sobre perfiles fitoquímicos	50
7. Efecto de la FES sobre propiedades nutracéuticas de los fitoquímicos presentes en el sustrato.....	50
a. Capacidad antihipertensiva.....	50
b. Capacidad Antimutagénica	51
V. JUSTIFICACIÓN.....	54
VI. HIPÓTESIS.....	55
VII. OBJETIVOS.....	56
A OBJETIVO GENERAL.....	56
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	57
A MATERIALES	57
B MÉTODOS	57
1. Preparación de harina de frijol común bioprocesada (HFCC).....	57
a. Preparación del sustrato	57
b. Inóculo	58
c. Fermentación	58
2. Obtención de los extractos fenólicos de HFCC y HFCCB	58
a. Extracción de fenólicos libres	58
b. Extracción de fenólicos ligados.....	59
3. Determinación de la actividad antihipertensiva de HFCC y HFCCB	59
a. Ensayos <i>in vitro</i> para determinar actividad inhibitoria de la ECA.....	59
b. Ensayos <i>in vivo</i> para determinar capacidad antihipertensiva	60
4. Determinación de la actividad antimutagénica <i>in vitro</i> de HFCC y HFCCB.....	61
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
A. Potencial antihipertensivo de harinas de frijol común variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa crudo y bioprocesado	64
1. Potencial antihipertensivo <i>in-vitro</i> (inhibición de ECA por extractos fenólicos de HFCC y HFCCB)	64

2. Potencial antihipertensivo <i>in-vivo</i> (Análisis del efecto de extractos fenólicos de HFCC y HFCEB sobre la presión arterial sistólica (PAS) en ratas espontáneamente hipertensas)	78
a. Efecto de la administración de extractos fenólicos de harinas de frijol común sobre la PAS en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a la administración	80
b. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y dosis administrada sobre la disminución de PAS en REH suplementadas con extractos fenólicos de harinas de frijol común	91
B. Potencial antimutagénico <i>in vitro</i> de harina de frijol común (variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa) crudo y bioprocesado	101
X. CONCLUSIONES	115
XI. BIBLIOGRAFÍA	117
ABREVIATURAS.....	138

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales productores de frijol a nivel mundial	22
2	Principales estados productores de frijol en México	23
3	Composición química y valor nutrimental del frijol común	32
4	Fitoquímicos presentes en frijol común	37
5	Microorganismos utilizados para la FES	44
6	Efecto de la fermentación en estado sólido sobre la composición química y valor nutrimental de leguminosas	52
7	Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los niveles de fitoquímicos en leguminosas	53
8	Valores de IC₅₀ y porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en extractos fenólicos de frijol común.	65
9	Efecto del proceso, variedad y tipo de extracto sobre el valor de IC₅₀ de extractos fenólicos de frijol común variedad Azufrado Higuera y Negro Jamapa	69
10	Efecto del proceso y la interacción variedad * extracto sobre el valor de IC₅₀ de extractos fenólicos de frijol común variedad Azufrado Higuera y Negro Jamapa	70
11	Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de 50 mg/kg sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.	82
12	Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de 150 mg/kg sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.	84
13	Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de 250 mg/kg sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.	86
14	Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de 500 mg/kg sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.	88
15	Valores de ΔPAS a las 6 h de la administración de diferentes dosis (50, 150, 250, 500 mg/kg) de extractos fenólicos libres y ligados, de harinas de frijol común crudo y bioprocesado	92
16	Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y dosis administrada sobre la disminución de PAS (ΔPAS mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.	94
17	Efecto de las variables proceso, variedad de frijol y dosis administrada sobre la disminución de PAS (ΔPAS mmHg) en ratas	95

espontáneamente hipertensas.

18	Índice de mutagenicidad y número de revertantes/plato de extractos fenólicos de frijol común.	102
19	Porcentaje de inhibición de mutagenicidad de extractos fenólicos de frijol común.	103
20	Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y sus interacciones sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.	105
21	Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y la interacción de las variables variedad * tipo de extracto sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Estructura del grano de frijol común	25
2	Diagrama de flujo de para la fermentación en estado sólido de frijol común	49
3	Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición respecto a diferentes dosis evaluadas de extractos fenólicos de frijol común variedad Azufrado Higuera crudo y bioprocesado	66
4	Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición respecto a diferentes dosis evaluadas de extractos fenólicos de frijol común variedad Negro Jamapa crudo y bioprocesado.	67
5	Diagrama de Pareto de los efectos principales e interacciones. A: Proceso , BC: Interacción variedad de frijol * extracto sobre el valor de IC₅₀ .	71
6	Efecto principal de la variable proceso sobre el valor de IC₅₀ .	73
7	Efecto de la interacción variedad de frijol * extracto sobre el valor de IC₅₀ .	74
8	Efecto de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de 50 mg/kg , sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.	83
9	Efecto de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de 150 mg/kg , sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.	85
10	Efecto de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de 250 mg/kg , sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.	87
11	Efecto de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de 500 mg/kg , sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.	89
12	Efecto de las variables proceso, variedad de frijol y dosis, así como las interacciones proceso * variedad de frijol, proceso * dosis, variedad * tipo de extracto, variedad * dosis, tipo de extracto * dosis y error puro sobre la disminución de la presión arterial sistólica (ΔPAS) en ratas espontáneamente hipertensas	96
13	Efecto de interacción gráfico sobre la disminución de la presión arterial sistólica (ΔPAS) en ratas espontáneamente hipertensas.	98
14	Diagrama de Pareto de los efectos principales e interacciones. A: Proceso , B: Variedad de frijol , C: Tipo de extracto BC: Interacción variedad de frijol * tipo de extracto sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.	107
15	Efecto principal de la variable proceso sobre el porcentaje de inhibición mutagénica.	108
16	Efecto de la interacción de las variables variedad de frijol*tipo de extracto sobre el porcentaje de inhibición mutagénica.	109

I. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la fermentación en estado sólido (**FES**) en condiciones optimizadas sobre las propiedades antihipertensiva y antimutagénica de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Para obtener harinas de frijol común bioprocesado (**HFCB**) por **FES** se utilizó el hongo *Rhizopus oligosporus* (1×10^6 esporas/mL) y condiciones óptimas de temperatura de fermentación: 33.5°C y 38°C, y tiempo de fermentación: 108 h y 100 h, para las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa, respectivamente. A partir de harinas de frijol común crudo (**HFCC**) y **HFCB** se obtuvieron extractos de compuestos fenólicos en sus fracciones libres y ligadas. Se determinó la actividad antihipertensiva *in vitro* mediante el valor **IC₅₀** [concentración de extracto para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); entre más pequeño el valor **IC₅₀** mayor efecto antihipertensivo] de ambos extractos fenólicos mediante el kit ACE Kit-WST (A502-10). Para evaluar la capacidad antihipertensiva *in vivo* de los extractos se determinó la disminución de la presión arterial sistólica (**ΔPAS**) en ratas espontáneamente hipertensas (**REH**). Se administraron 4 concentraciones de extractos fenólicos (50, 150, 250 y 500 mg/kg), y se empleó captopril (10 mg/kg) como control positivo y agua destilada como control negativo. La actividad antimutagénica fue evaluada mediante el ensayo de Ames con *Salmonella typhimurium* YG1024 y el mutágeno 1-nitropireno. La **FES** incrementó significativamente la capacidad antihipertensiva *in vitro* e *in vivo* del frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa, disminuyendo los valores de **IC₅₀** y **ΔPAS**, respectivamente, para ambos extractos. Los extractos fenólicos libres y ligados de

HFCEB de ambas variedades de frijol, a una concentración de 500 mg/kg, fueron los tratamientos que causaron las mayores disminuciones en los valores de **PAS** (Δ **PAS**=-36.03 a -47.26mmHg) en **REH**, y no presentaron diferencias significativas con el captopril (Δ **PAS**= -48.61 mmHg) a las 6 h de estudio. De manera general, el efecto de los extractos fenólicos sobre el potencial antihipertensivo *in vitro* e *in vivo* presentó un comportamiento dosis-dependiente (a mayor concentración o dosis de extracto menores valores de **IC₅₀** o **PAS**). La **FES** también mejoró la actividad antimutagénica de ambas variedades de frijol, aumentando el porcentaje de inhibición de mutagenicidad por los extractos fenólicos libres y ligados, de 43.2-50.6% (antimutagenicidad positiva) en HFCC a 64.0-69.2% (antimutagenicidad fuerte) en **HFCEB**. De manera general, los extractos fenólicos de las harinas de frijol Negro Jamapa presentaron un mayor potencial antihipertensivo *in vivo* que los extractos fenólicos de las harinas del frijol Azufrado Higuera. En el caso de las actividades antihipertensiva y antimutagénica *in vitro*, los extractos de fenólicos libres de la variedad Azufrado Higuera presentaron mayor potencial de estas propiedades, mientras que los extractos de fenólicos ligados fueron los que presentaron mayores actividades en la variedad Negro Jamapa. En conclusión, la **FES**, en condiciones optimizadas, es una estrategia efectiva para mejorar el potencial antihipertensivo y antimutagénico de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Asimismo, las **HFCEB** representan una potencial alternativa natural para el control de la presión arterial elevada y la prevención de cáncer en personas que sufren o son propensas a estos padecimientos.

II. ABSTRACT

The aim of this research was to study the effect of solid-state fermentation (**SSF**) under optimized conditions on antihypertensive and antimutagenic properties of free and bound phenolic extracts of common bean varieties Azufrado Higuera and Negro Jamapa. To obtain bioprocessed common bean flours (**BCBF**) by **SSF**, the fungus *Rhizopus oligosporus* (1×10^6 spores / mL) and optimum fermentation temperature conditions were used: 33.5 ° C and 38 ° C, and fermentation time: 108 h and 100 h, for Azufrado Higuera and Negro Jamapa varieties, respectively. From raw common bean flours (**RCBF**) and **BCBF** were obtained extracts of phenolic compounds in their free and bound fractions. The antihypertensive activity was determined *in vitro* by the **IC₅₀** value [extract concentration to inhibit 50% of the activity of the angiotensin converting enzyme (**ACE**); the smaller the **IC₅₀** value, the greater antihypertensive effect] of both phenolic extracts using ACE Kit-WST kit (A502-10). To evaluate the *in vivo* antihypertensive capacity of the extracts, the decrease in systolic blood pressure (**ΔSBP**) in spontaneously hypertensive rats (**SHR**) was determined. Four concentrations of phenolic extracts (50, 150, 250 and 500 mg / kg) were administered; captopril (10 mg / kg) was used as a positive control and distilled water as a negative control. The antimutagenic activity was evaluated by the Ames test with *Salmonella typhimurium* YG1024 and 1-nitropyrene mutagen. **SSF** significantly increased *in vitro* and *in vivo* antihypertensive capacity of Azufrado Higuera and Negro Jamapa common bean, decreasing **IC₅₀** and **ΔSBP** values, respectively, for both extracts. Free and bound phenolic extracts of **HFCB** of both bean varieties, at a concentration of 500 mg / kg, were the treatments that caused the greatest decreases in the SBP values (**ΔSBP** = -

36.03 to -47.26mmHg) in **SHR**, and did not show significant differences with captopril (Δ **SBP** = -48.61 mmHg) at 6 h of the study. In general, the effect of phenolic extracts on antihypertensive potential *in vitro* and *in vivo* presented a dose-dependent behavior (the higher the concentration or the dose of the extract, the lower the **IC**₅₀ or **SBP** values). **SSF** also improved the antimutagenic activity of both bean varieties, increasing the percentage of inhibition of mutagenicity by free and bound phenolic extracts, from 43.2-50.6% (positive antimutagenicity) in **RCBF** to 64.0-69.2% (strong antimutagenicity) in **BCBF** . In general, phenolic extracts of common bean Negro Jamapa presented a greater antihypertensive potential *in vivo* than phenolic extracts of Azufrado Higuera variety. In the case of antihypertensive and antimutagenic activities *in vitro*, extracts of free phenolics of the variety Azufrado Higuera presented greater potential of these properties, while the extracts of bound phenolics were the ones that showed the highest activities in Negro Jamapa common bean. In conclusion, **SSF**, under optimized conditions, is an effective strategy to improve antihypertensive and antimutagenic potential of common bean Azufrado Higuera and Negro Jamapa. Likewise, bioprocessed common bean flours represent a potential natural alternative for the prevention of high blood pressure and development of cancer in people who are prone to these conditions.

III. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, sin embargo, también es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se ha indicado que existe "estrés oxidativo" cuando hay una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida. Numerosas investigaciones han asociado el estrés oxidativo con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares. Dentro de estos trastornos, considerados actualmente un problema de salud pública a nivel mundial, destaca la enfermedad cardiovascular como la principal causa de morbilidad y mortalidad en México y el mundo. Entre los principales factores que predisponen al desarrollo y complicación de las enfermedades cardiovasculares se encuentra la hipertensión arterial. En México, la prevalencia de hipertensión arterial en el año 2016 fue de 25.5%, siendo más alta en adultos con obesidad y diabetes (Shama-Levy y col., 2016). El tratamiento principal para esta enfermedad involucra tanto tratamientos no farmacológicos como la terapia dietética y cambios de estilo de vida así como medicamentos sintéticos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Chen y col., 2007). Recientemente se han encontrado algunos inhibidores naturales de la enzima convertidora de angiotensina en diferentes fuentes, principalmente de origen vegetal como las leguminosas. En estos granos se ha reportado una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden ser considerados compuestos bioactivos debido a su actividad antioxidante (AAox), además

de muchos otros fitoquímicos como flavonoides y ácidos fenólicos, que han ganado atención como agentes antihipertensivos(Cardador-Martínez y col., 2002).

Recientemente se ha propuesto que para su consumo, el grano de frijol común debe someterse a diversos tipos de procesamiento. Dentro de estas alternativas tecnológicas, la fermentación representa un tercio del consumo total de alimentos a nivel mundial. Se ha reportado que estos productos fermentados presentan valores de actividad antioxidante mayores que el al grano sin procesar. La fermentación en estado sólido (FES), es un proceso biotecnológico que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial. Sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para permitir el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo. Uno de los productos elaborados a partir de este bioproceso es el tempe, un alimento de origen indonés obtenido tradicionalmente a partir de granos de soya, realizada por hongos filamentosos del género *Rhizopus*. Además, otras leguminosas, como el frijol común, han sido utilizadas para producir tempe. El incremento de la actividad antioxidante durante la FES de granos, se ha atribuido a la liberación de compuestos fenólicos causada por la hidrólisis enzimática realizada por el hongo. Esta reacción cataliza la liberación de ácidos fenólicos y flavonoides conjugados. Muchos de estos fitoquímicos, incrementados durante la FES, exhiben diversas propiedades nutraceuticas, como potencial antihipertensivo y antimutagénico. En granos de frijol común se ha reportado que la FES incrementa el potencial antidiabético y antihipertensivo *in vitro* (McCue y col., 2005). Asimismo, Guzmán-Uriarte y col. (2013) y Rochín-Medina y col. (2015) reportaron condiciones óptimas de FES para obtener harinas de frijol común

bioprocesado (HFCEB), de las variedades Azufrado Higuera y Negro Nayarit, con alto contenido de compuestos fenólicos. En estas investigaciones también se encontró que, estos materiales fermentados exhibieron una buena actividad antihipertensiva *in vitro*. Sin embargo, en la literatura no existen reportes sobre el impacto de la FES sobre el potencial antihipertensivo en modelos *in vivo* y el potencial antimutagénico *in vitro* de frijol común. Es por ello que, el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de la FES en condiciones optimizadas sobre las propiedades antihipertensiva *in vivo* y antimutagénica *in vitro* de frijol común variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. Estrés oxidativo

1. Radicales libres

En la naturaleza existe una gran cantidad de compuestos que son oxidados por el oxígeno. Estas reacciones, denominadas de óxido-reducción son muy importantes puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de energía libre a partir de ellas. Sin embargo, aunque el oxígeno es imprescindible para la vida, también puede ser una fuente de enfermedad debido a la producción incontrolada de radicales libres. Desde el punto de vista químico estos se definen como todas aquellas especies químicas que presentan un electrón desapareado o impar en su orbital exterior, confiriéndole una gran inestabilidad (Venereo Gutiérrez, 2002). Los radicales libres son muy reactivos, dañan las macromoléculas presentes en las células (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y también alteran los procesos celulares como la funcionalidad de la membrana, producción de enzimas, respiración celular, entre otros (Hernández-Saavedra y McCord 2007).

Existe un término que incluye a los radicales libres y algunas especies no radicálicas, pero estos participan en reacciones que llevan a la elevación de agentes prooxidantes y se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO), algunas de ellas incluyen el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-) y peróxido (ROO). En una célula normal existe un equilibrio entre los compuestos prooxidantes y la capacidad antioxidante. Cuando el aumento del contenido intracelular de EROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés

oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Céspedes Miranda y col., 2000).

2. Daños por ERO a biomoléculas

a. Lípidos

Los lípidos son las moléculas que sufren el mayor daño debido a la peroxidación lipídica inducida por EROS. Estas reacciones afectan a estructuras que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, generando una alteración de la permeabilidad de la membrana celular, provocando edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo se desencadena por diversas causas, principalmente por la naturaleza cualitativa y cuantitativa del iniciador, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana plasmática y la activación de enzimas como la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) responsable de iniciar la cascada de reacciones que llevan a la producción de peróxidos orgánicos a partir de los ácidos grasos, los cuales son responsables de los efectos citotóxicos (Maritim y col., 2003).

b. Proteínas

Las proteínas son oxidadas en un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, además ocurre el entrecruzamiento de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilo (Berlett y Stadtman, 1997). La extracción de iones hidrógeno del grupo tiol de la cisteína conduce a la formación de enlaces disulfuro y conlleva a un plegamiento anormal en las proteínas. Esto puede conducir a una función anómala o pérdida de la misma, incluso causar muerte celular (Myatt, 2010).

c. Ácidos nucleicos

En relación al ácido desoxirribonucleico (ADN), se han observado fenómenos de mutagénesis y carcinogénesis, con la consecuente pérdida de expresión o síntesis de una proteína por el daño en un gen específico, provocado por la modificación oxidativa de las bases nitrogenadas, deleciones, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citocinas del ADN, responsables de la activación de genes (Wiseman y Halliwell, 1996). El daño en genes supresores de tumores puede ser ocasionado por la modificación de un simple cambio de una base nitrogenada crítica de la secuencia (Valko y col., 2004)

B. Enfermedades crónico degenerativas

Las enfermedades o padecimientos pueden categorizarse como simples y complejos, las primeras son aquellas que generalmente son resultado de alteraciones recientes, sin modificar ampliamente la fisiología del organismo y que requieren de un tratamiento inmediato para su rápida recuperación. Sin embargo, las enfermedades complejas, entre las que se pueden incluir las enfermedades crónico-degenerativas (ECD), las cuales producen una serie de alteraciones fisiopatológicas amplias y complejas y que requieren de un tratamiento a largo plazo para controlar la enfermedad, sin poder evitar su progresión. El desarrollo de ECD resulta de la interacción de dos factores condicionantes: La predisposición genética y los factores ambientales o modificables, como la alimentación y el estilo de vida (Arroyo, 2008)

Recientemente, la prevalencia de ECD ha ido en incremento. En México, estos padecimientos predominan entre la población en edad adulta y constituyen las

principales causas de mortalidad general. La diabetes, dislipidemias y la hipertensión arterial destacan entre estos padecimientos, por su elevada prevalencia y graves complicaciones, como son las enfermedades cardiovasculares, neoplasias, enfermedad cerebrovascular, y las nefropatías. Estudios han posicionado al estrés oxidativo como una de las grandes causas del desarrollo de estas enfermedades, ya que este se presenta en diversos estados patológicos en donde ocurre alteración celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de ECD (González-Camaño y col., 2014)

1. Hipertensión

a. Generalidades

De acuerdo a la OMS (AÑO), la hipertensión arterial (HTA), es definida como la elevación crónica de la presión sistólica, diastólica o ambas, por encima de los valores normales. La HTA es uno de los principales factores de riesgo para el padecimiento de enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, importantes causas de mortalidad en México (Campos-Nonato y col., 2013). De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), la prevalencia de hipertensión arterial en el año 2016 fue de 25.5%, siendo más alta en adultos con obesidad y diabetes por lo que la prevalencia de HTA en México se encuentra entre las más elevadas en el plano mundial (Shama-Levy y col., 2016).

Entre los factores que se han identificado y que contribuyen a la aparición de HTA, diversos estudios citan la edad, una alta ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas, tabaquismo, inactividad física y presencia de enfermedades crónicas como obesidad, dislipidemias y diabetes (Pak y col., 2014).

b. Fisiopatología

En el organismo, la presión arterial es controlada por diferentes vías bioquímicas. Tradicionalmente el control se ha relacionado con el sistema renina-angiotensina (SRA). En éste, la principal fuente de renina activa en la circulación es la secretada por las células yuxtaglomerulares en el riñón. El angiotensinógeno (AGI) es un glucopéptido con un peso molecular de 60 kDa y se distribuye en numerosos tejidos, además de plasma y el líquido cefalorraquídeo. AGI es el único precursor conocido de la angiotensina I, así como el único sustrato conocido de renina. Existen varios factores que influyen en la liberación de renina, incluyendo la presión de la perfusión renal, el agotamiento de sal, y la estimulación de β_2 -receptores por la aldosterona. La renina actúa sobre el angiotensinógeno (AGI) para generar la angiotensina I (Tso y Jampol, 1982). La angiotensina I, es el decapeptido liberado de la porción N-terminal del AGI por la acción de la renina. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA: EC 3.4.15.1) es una hidrolasa dipeptidildicarboxilasa que utiliza Zn^{2+} y Cl^- como cofactores. Esta enzima elimina el dipéptido C-terminal HL de la angiotensina I dando lugar a la formación de angiotensina II, un potente vasoconstrictor. Finalmente, la angiotensina II provoca que las glándulas suprarrenales liberen aldosterona, lo que aumenta la reabsorción de sales y agua en el riñón, conduciendo a un aumento en el volumen de líquido extracelular y por lo tanto al aumento de la presión arterial. Por lo tanto, la inhibición de la ECA tiene un efecto hipotensivo sobre el organismo (Crisan y Carr, 2000).

La ECA también cataliza la eliminación del dipéptido C-terminal de la bradicidina, un potente vasodilatador que regula diversos procesos biológicos, incluyendo la liberación de óxido nítrico endotelial, un vasodilatador arterial que aumenta el flujo sanguíneo renal, resultando en la formación de fragmentos de péptidos inactivos. Por lo tanto, al inhibir a la ECA no sólo disminuye la formación de angiotensina II, sino que también aumenta la bradiquinina disponible, reduciendo la presión sanguínea (Danilczyk y col.,2004).

c. Estrategias para controlar la presión arterial

1) Medicamentos comercialmente disponibles

Existe una gran cantidad de medicamentos comerciales para el control de la hipertensión arterial. Principalmente se incluyen el captopril, benazepril, enalapril y lisoprinil, que son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), candesartán, eprosartán e ibersartán que son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II, los inhibidores de renina como aliskirén y bloqueadores de canales de calcio, como el propranolol, nadolol y metoprolol (Wolf-Maier y col., 2004). Otro tipo de tratamiento son los diuréticos, como las tiazidas, ahorradores de potasio y antagonistas de aldosterona, que disminuyen la cantidad de agua y sal del organismo y dilatan las paredes de las arterias (Pepine y col., 2003).

La utilización de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina se ha consolidado como uno de los tratamientos más efectivos contra la hipertensión arterial. Sin embargo se ha revelado que el uso prolongado de estos medicamentos puede dañar el funcionamiento del sistema renal (Münzel y Keaney 2001).

2) Fitoquímicos con propiedades antihipertensivas

La investigación de compuestos naturales con efecto antihipertensivo son el presente y futuro de la investigación dentro de la línea de alimentos funcionales, los cuales pueden ayudar en la prevención y tratamiento de esta patología. En la actualidad ha surgido el interés de identificar compuestos naturales como una fuente de inhibición natural de la ECA. Entre los fitoquímicos presentes en los alimentos, los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiados, por su potencial antioxidante y prevención de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y cáncer (Creus, 2004).

La mayoría de los ácidos fenólicos forma interacciones carga-carga con el ión zinc en el sitio activo de la ECA, vía el átomo de oxígeno en la molécula carboxilada. Estos compuestos presentan diferentes interacciones moleculares con los aminoácidos del sitio activo de ECA, que da lugar a un complejo estable entre la molécula de ácido fenólico y ECA. Esta interacción con el ion zinc, estabilizado por interacciones con otros aminoácidos en el sitio activo, puede ser causante de la actividad inhibidora de ECA observada por los ácidos fenólicos (Al Shukor y col., 2013). Otros flavonoides (rutina), estilbenos (resveratrol), y los otros compuestos fenólicos (catecol y pirogalol) pueden inhibir la actividad de la ECA sólo mediante interacciones con los aminoácidos en el sitio activo (Actis-Goretta y col., 2003). Algunos de los fitoquímicos que se destacan por presentar actividad antihipertensiva tanto *in vitro* como *in vivo* y que se encuentran presentes en el frijol común son ácidos fenólicos como el ácido ferúlico y el ácido

clorogénico, y flavonoides como kaempferol y quercetina (Duarte y col.,2001; Suzuki y col., 2006; Paredes-Carreras y col, 2015).

2. Cáncer

a. Generalidades

Los cambios demográficos, económicos y ambientales han repercutido en todos los aspectos de la vida humana, y entre ellos en la incidencia de enfermedades como el cáncer. Esta patología se define como un conjunto de neoplasias malignas de origen epitelial, mesenquimal (sarcomas) y hematológico. Esta entidad, mediante un proceso de carcinogénesis involucra diferentes mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en protooncogenes, genes supresores tumorales, genes de reparación celular y microRNAs, con el fin de conferirle un fenotipo maligno a un clon celular; es decir, adquiere la capacidad de ser autodependiente, invadir, evadir la respuesta inmune y dar metástasis a otras partes del cuerpo (Reuter y col., 2010). Estos cambios genéticos son causados por la exposición ambiental, química, física y biológica, por lo que es considerada como una enfermedad genética multifactorial, y se ha convertido en un problema de salud pública mundial.

En 2008, se reportaron en el mundo 7.6 millones de muertes por cáncer, representando el 13% del total de las muertes, y se posicionó como la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. Se calcula que para el 2030 sean 12 millones por año y ocupe el primer lugar de mortalidad. En México, la mortalidad por cáncer representa el 13% del total de las muertes, ocupando el tercer lugar con una tasa de 62.8 por cada 100,000 habitantes (Aldaco-Sarvide y col., 2012).

b. Mutagénesis y carcinogénesis

La mutagénesis es el proceso por el que se genera una mutación, ésta se define como un cambio hereditario en el material genético. Los mutágenos son agentes físicos o químicos capaces de inducir en los seres vivos varias clases de cambios deletéreos heredables. El ADN celular está organizado en genes y éstos a su vez, en cromosomas, los cuales en los organismos superiores, se alojan en el núcleo celular. Aunque la información genética es muy estable, las mutaciones ocurren espontáneamente, con frecuencias muy bajas en las células que aparentemente no están expuestas a agentes mutagénicos externos. Las mutaciones pueden ocurrir al azar, por lo que no es posible predecir en cual gen o célula en particular aparecerá una mutación. Se sabe que los tejidos tienen diferente sensibilidad a los mutágenos, además, en algunos individuos, la sensibilidad hacia ciertos mutágenos es mayor que en otros (Díaz-Arce, 2004). Existen diversos mecanismos por los cuales se puede desarrollar mutagénesis, como daños en la división cromosómica, daños en la replicación del ADN o fallas en la reparación del mismo. Este último mecanismo ha sido ampliamente estudiado y ha sido el más relacionado al desarrollo de cáncer, ya que cuando las células con sistemas deficientes de reparación se exponen a mutágenos, el proceso de error en la reparación no elimina el daño del ADN y replica los efectos mutagénicos inducidos. Aunque esto puede reducir la muerte celular, causa la síntesis de ADN mutado, y como resultado, el grado de error genético se incrementa en la descendencia (Murphy y col., 1991).

La carcinogénesis en cambio, se define como el fenómeno por el que un tejido normal genera el crecimiento de tejidos nuevos, diferentes al original. Estos tejidos

nuevos se conocen como tumores y se clasifican en benignos o malignos. Puede ocurrir por dos causas principales: (1) El efecto de agentes externos (ambientales), o (2) Una predisposición genética a la formación de tumores (Jones, 2003). Sin embargo, actualmente se ha identificado una gran variedad de compuestos químicos que pueden inhibir la mutagénesis y el desarrollo de cáncer (acción antimutagénica o anticarcinogénica). Muchos de estos compuestos son naturales, y se encuentran en alimentos, predominantemente de origen vegetal (de Mejia y col., 1999).

c. Cáncer y estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno inducen todas las formas de daño en el ADN, incluyendo la modificación de bases, sitios de bases libres, la rotura del filamento, y entrecruzamientos de ADN-proteína, pero el espectro específico de los productos depende de las especies reactivas implicadas. La característica definida del estrés oxidativo es la presencia de especies reactivas, y las células cancerosas típicamente generan más especies reactivas del oxígeno que las células normales. Tanto la señalización oncogénica y la regulación disminuida de la función mitocondrial en los tumores puede contribuir a la generación de ERO, las cuales son altamente reactivas y probablemente contribuyen a los elevados niveles de daño endógeno al ADN observado en las células cancerosas (Simic, 1988). Además, las ERO son importantes mediadores de la señalización y su presencia puede contribuir a la transformación. Está bien definido que las ERO pueden dañar el ADN genómico. Los radicales libres, como el radical OH causa oxidación en el ADN, mientras que el ONOO^- causa tanto oxidación como nitración en las bases nitrogenadas. Una de las consecuencias del daño oxidativo

a los nucleótidos es la generación de mutaciones o bien, la alteración en la expresión de un gen (Breimer, 1990).

Algunas proteínas que reciben modificación directa por las ERO y que influyen en la progresión de tumores son c-Jun y c-Fos, ambas componentes del factor de transcripción AP-1, el cual regula la expresión de genes relacionados con proliferación celular y el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), el cual regula la expresión de varias proteínas involucradas en las vías de supervivencia y muerte. Además, una activación incrementada del NF- κ B genera un aumento en la síntesis de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Königsberg y col., 2008).

C. Alimentos funcionales

1. Definición

Un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutrimental o no nutrimental, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones en el organismo, con un efecto fisiológico por encima de su valor nutricional y cuyas acciones positivas justifican su carácter funcional. Hace aproximadamente 20 años que se habla de los alimentos funcionales, y su movimiento comenzó en Japón (Olagnero y col., 2007). En Estados Unidos aparecieron una década después, con la peculiaridad de que dentro de sus regulaciones se requiere que el alimento sufra alguna modificación. Sin embargo, según la concepción europea, el alimento funcional debe seguir siendo un

alimento en todo momento, es decir, debe ejercer sus propiedades funcionales consumido como tal (Farjas-Abadía, 2003).

2. Alimentos nutraceuticos

Los nutraceuticos son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales, que se caracterizan mediante procesos biotecnológicos, y proveen propiedades benéficas para la salud. A diferencia de los alimentos funcionales, estos son productos elaborados a partir de alimentos, que comúnmente se comercializan en forma de píldoras o polvos (Birute-Guzmán y col., 2009). Los nutraceuticos pueden clasificarse de acuerdo al nutrimento que contenga (carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos), al compuesto químico (fibra, Isoflavonas, antioxidantes, carotenos, licopenos, compuestos fenólicos), y si tiene la presencia de un microorganismo benéfico se categoriza como prebiótico (Serrano y col., 2006).

3. Compuestos antioxidantes

Si se conocen los efectos negativos que provocan los radicales libres, es más sencillo entender el efecto que tienen los antioxidantes sobre la salud. Estos se definen como aquellos compuestos cuya función es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias para reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno, formando complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales libres y por consiguiente desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades derivadas del estrés oxidativo (Zamora, 2007). A lo largo del tiempo se ha estudiado la presencia de compuestos antioxidantes en los alimentos, encontrando

diversos compuestos en una gran cantidad de ellos. Reyes y col. (2014) desarrollaron una bebida con propiedades nutraceuticas a base de maíz extrudido y frijol fermentado. Esta presentó una alta actividad antioxidante y alto contenido de compuestos fenólicos, además de capacidad antihipertensiva y antimutagénica altas, siendo una buena opción para la prevención de enfermedades, principalmente las crónico-degenerativas (Reyes-Moreno y col., 2014).

D. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L)

1. Origen

El cultivo de frijol se considera uno de los más antiguos. Algunos de sus hallazgos arqueológicos indican que se conocía hace algunos 5000 años antes de Cristo. Los primeros trabajos acerca del origen del frijol se remontan a 1967, en donde afirmaron que la forma silvestre del frijol se encuentra en Mesoamérica, principalmente en el occidente y sur de México, a lo largo de la Sierra Madre Occidental, y de ahí se extendió posteriormente al resto del Continente Americano, para luego ser domesticado tanto en Mesoamérica como en Sudamérica (Hernández-López y col., 2013). Taxonómicamente, el frijol corresponde a la especie del género *Phaseolus*. Su nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753, a la tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae, familia Fabaceae y al orden Fabales. El género *Phaseolus* incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol tépari), *P. coccineus ssp. coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus* = *P. polyanthus* (= *P. coccineus ssp. darwinianus*) (frijol del año) (Ramírez y Rangel, 2011).

2. Producción

El frijol es cultivado en gran cantidad a nivel mundial. Según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el continente asiático y americano son los mayores productores, con 10.3 y 7.3 millones de toneladas respectivamente (**Cuadro 1**) (FAOSTAT 2014). En México, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) es el segundo producto más importante en el sector agroalimentario, no sólo por ser una fuente de ingresos para miles de productores, sino también por ocupar un lugar importante dentro de la dieta de la población. De acuerdo a datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el 2014 se produjeron 1, 273,957.14 toneladas de frijol en México, de los cuales Sinaloa obtuvo 161,520.45 toneladas(SIAP, 2014) (**Cuadro 2**).

3. Estructura del grano de frijol

La semilla de frijol, consta de dos partes principales: Una cubierta o testa, y dos cotiledones. La testa sirve como una barrera protectora entre el cotiledón y el exterior. Está formada por tres capas de células: empalizada, subepidérmica y parénquima. Frecuentemente en la testa se puede observar el micrópilo, que es una pequeña abertura del grano. En muchas ocasiones está asociado con una cicatriz llamada hilio, que marca el punto donde la semilla se separó de la vaina (Deshpande y Cheryan, 1986) 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 plúmula está encerrada hacia el interior del grano.

Cuadro 1. Principales productores de frijol a nivel mundial

País	Producción (Toneladas)
India	3,870,000.00
Myanmar	3,718,660.00
Brasil	3,093,592.50
México	1,284,295.50
Estados Unidos	1,219,755.00

FAOSTAT (2014)

Cuadro 2. Principales estados productores de frijol en México

Estado	Producción (Toneladas)
Zacatecas	355,882.16
Durango	192,157.75
Sinaloa	161,520.45
Chihuahua	124,764.90
Chiapas	61,412.08

SIAP (2014)

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 (Paredes-Lopez y col.,1989). Los cuerpos proteínicos son generalmente esféricos y relativamente menores que los gránulos de almidón y están rodeados por una membrana lipoproteíca., La testa representa el 9% del grano en base seca, los cotiledones un 90% y el 1% corresponde al embrión(Reddy y col.,1984). En la **figura 1** se presenta la anatomía del grano de frijol.

4. Composición química

La gran importancia del frijol común radica en que es la principal fuente de nutrimentos, en países en desarrollo. En cuanto a su valor nutritivo, el frijol representa una excelente fuente de proteínas, aminoácidos esenciales y hierro. Este presenta una proporción similar de carbohidratos en comparación a los cereales, sin embargo se considera que contiene más del doble de proteína. Además, también es fuente de potasio, magnesio, zinc, fibra, almidones, ácido fólico y tiamina, que aparecen en cantidades significativas, y unido al hecho de que es una gran fuente de proteínas, le permite ser utilizado como alternativa en sustitución de carnes y otros productos proteicos (Maldonado y col., 2015).

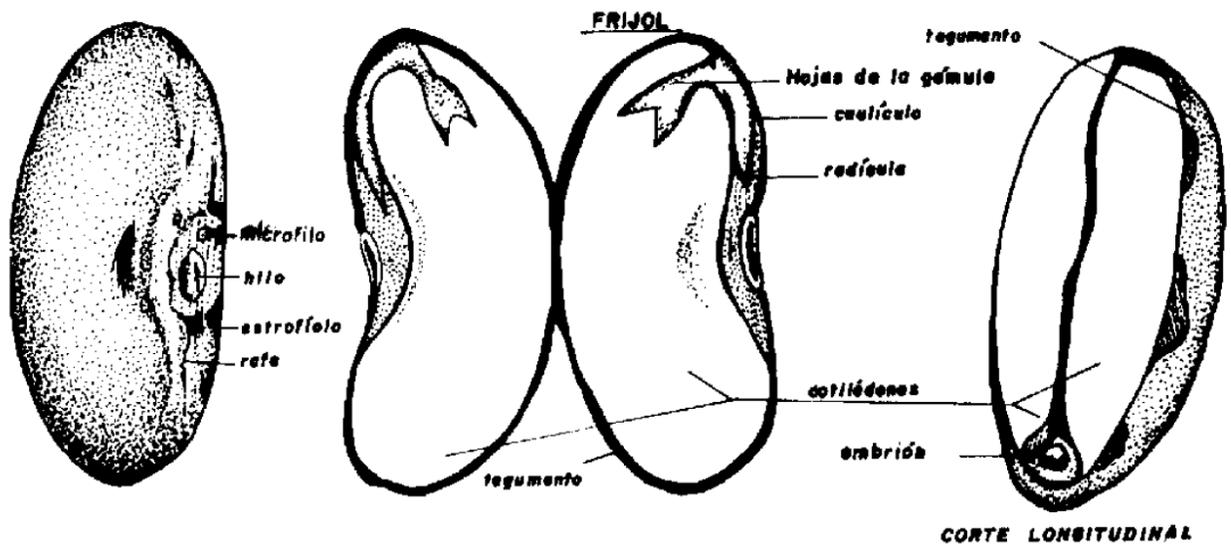


Figura 1. Estructura del grano de frijol común. FAO (1993)

a. Proteína

El frijol común representa la principal fuente de proteínas de bajo costo en la dieta del hombre, lo que contribuye positivamente en la importancia que este tiene, ya que las variedades de *Phaseolus vulgaris* L son las más consumidas en Latinoamérica. El contenido de proteína en cultivos de frijol común comercial es de 14 a 33%. La proteína del frijol está concentrada principalmente en los cotiledones (27%) y ejes embrionarios (48%), mientras que la testa de la semilla contiene solo el 5%. El grano es rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero presenta deficiencias en los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína (Mederos, 2013).

Las principales proteínas presentes en la semilla de frijol común son las lectinas, faseolinas y arcelinas. Las lectinas, también conocidas como fitohemaglutininas (PHA), se pueden definir como glicoproteínas de origen no inmune que son capaces de reconocer y unirse reversiblemente a fracciones de carbohidratos sin alterar su estructura covalente (Blair y col., 2007).

1) Calidad de la proteína

Una de las características benéficas más importantes de la proteína de frijol común es su extraordinario nivel de lisina. Dichos niveles satisfacen los requerimientos actuales de un adulto y los requerimientos para los niños en relación con el patrón de referencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Sin embargo, no solo la composición de aminoácidos es importante, también lo es su biodisponibilidad. Puesto que la mayor parte de las proteínas de frijol son de reserva, su composición de aminoácidos y su estructura juegan un papel

importante en la determinación de la calidad nutritiva del total de la proteína de la semilla. Las proteínas del frijol común son de valor nutricional relativamente bajo, amenos que se sometan a tratamientos térmicos. Los valores de relación de eficiencia proteínica van de 0.7 a 1.5 en una escala de 0 a 2.5, mientras que la digestibilidad proteínica es de 52 a 75% dependiendo de la variedad de frijol. En particular la faseolina es altamente resistente a la hidrólisis enzimática. El bajo grado de hidrólisis puede ser explicado principalmente por su compacta y rígida estructura, y su alta hidrofobicidad, lo que limita la accesibilidad de las proteasas (Molina y Bressani, 1975). Por lo que el bajo valor biológico se atribuye además de su deficiencia en aminoácidos azufrados, a su compacta estructura química difícil de hidrolizar por las enzimas proteolíticas, y a la presencia de factores no nutricionales (ácido fítico, taninos, saponinas, inhibidores de proteasas y lectinas) que limitan la digestibilidad de la proteína y la absorción de los aminoácidos en el tracto digestivo, y asimismo, la de otros componentes (Barampama y Simard, 1993).

b. Hidratos de carbono

Los carbohidratos son el componente químico que se encuentra en mayor cantidad en el grano de frijol, ya que representa entre 55 y 65% del peso total de la semilla. Los principales carbohidratos de esta leguminosa son monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. De ellos, el almidón y otros polisacáridos (fibra dietética) son los principales constituyentes (De León y col., 1990).

c. Almidón resistente

Dentro del grupo de los polisacáridos, el almidón es el principal constituyente en casi todas las semillas de leguminosa. En el grano de frijol común constituye del 35 al 60% del peso seco de la semilla. Es un carbohidrato de reserva formado por una mezcla de dos polisacáridos muy similares, amilosa y amilopectina(Sandoval-Gallegos, 2007). El almidón es considerado un carbohidrato disponible, que puede ser completamente digerido y absorbido en el intestino delgado. Sin embargo, una fracción del almidón resiste la hidrólisis por las enzimas digestivas, sigue su tránsito por el intestino delgado, y llega al intestino grueso donde es fermentado por la microflora del colon. Esta fracción, llamada almidón resistente (AR), se define como la suma del almidón y los productos de la degradación de este no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos. La clasificación principal del AR está basada en la naturaleza del almidón y las características físicas del alimento. Se destacan tres grupos: el AR1 correspondiente a los almidones físicamente inaccesibles, ósea, almidones atrapados dentro de una matriz celular, como en las leguminosas. El AR2 está integrado por gránulos nativos de almidón, cuya cristalinidad los hace menos susceptibles a la hidrólisis enzimática y finalmente los AR3 son las fracciones de almidón retrogradado, formadas en alimentos cocinados y almacenados a temperatura ambiente o baja (Vargas-Torres y col 2006).

d. Fibra dietaria total

La fibra dietética se define generalmente como las macromoléculas presentes en la dieta que se resisten a la digestión por enzimas endógenas humanas, y se compone esencialmente de los restos de la pared celular vegetal, tales como la celulosa,

hemicelulosa y lignina. No constituye un grupo químico definido; en cambio, representa una combinación de sustancias químicamente heterogéneas tales como celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas, mucílagos, almidón resistente, otros polisacáridos y la lignina (Srivastava y Vasishtha, 2013). La fibra a través del tracto gastrointestinal, puede interactuar con diferentes elementos y captar agua. Este hecho la convierte en un elemento muy importante en el proceso de la digestión, ya que limita y/o disminuye la velocidad de absorción de algunos nutrientes, y favorece el tránsito intestinal. Dadas estas características, la fibra permite una absorción más lenta de la glucosa, lo cual condiciona índices glicémicos moderados y, por lo tanto, contribuye a controlar la hiperinsulinemia, y disminuye las concentraciones del colesterol en la sangre hasta el 10% (Vahouny y Kritchevsky, 2013).

La fibra dietaría se clasifica principalmente en dos tipos soluble e insoluble. La fibra dietaría insoluble incluye celulosa, lignina y algunas hemicelulosas, mientras que la soluble incluye pectinas, gomas mucílagos y algunas fracciones de hemicelulosa. Cada uno de estos ejerce efectos fisiológicos específicos. Las semillas de las leguminosas contienen más fibra dietaría que los cereales. La fibra en el frijol común de ciertas variedades puede cambiar de 16 -19% crudo a 23-27% cocinado, el cocimiento hace que la fibra soluble disminuya mientras que la fibra insoluble aumenta (Du y col., 2014).

e. Lípidos

El frijol común contiene de 1.5 a 6.2% de lípidos dependiendo de la variedad y de la especie. Los lípidos neutros son la clase predominante y están constituidos principalmente por triglicéridos, junto con pequeñas cantidades de ácidos grasos libres, esteroides y ésteres de esteroides. Los lípidos del frijol tienen una gran variedad de ácidos

grasos y, en particular, niveles sustanciales de ácidos grasos insaturados como el oleico (18:1) (7 - 10%), linoléico (18:2) (21 - 28%), y linolénico (18:3) (37 - 54%). También se encuentran los ácidos grasos saturados, siendo el principal el ácido palmítico representando el 10 a 15% del total(Lo Turco y col., 2016).

f. Vitaminas y minerales

El frijol común crudo es una fuente relativamente buena de vitaminas solubles en agua, especialmente tiamina (0.9-1.1 miligramos/100 gramos), niacina (1.2-2.7 miligramos/100 gramos) y ácido fólico (0.2-0.6 miligramos/100g). El frijol común puede contribuir con cantidades importantes de tiamina y ácido fólico a la dieta, ya que una porción de 100 gramos contiene casi la cantidad diaria recomendada para niños y satisface plenamente la ingesta diaria de los adultos. Los valores de retención de estos nutrientes durante el cocimiento varían de 70 a 76% dependiendo de la vitamina (Messina, 2014).

Respecto a los minerales, el contenido en las semillas de frijol se encuentra entre 3 y 5% (base seca) dependiendo de la variedad, además en su composición se encuentran presentes los 15 minerales esenciales requeridos por los seres humanos. Las semillas de frijol pueden proporcionar de un 10 a 20% de los requerimientos de un adulto en cuanto a minerales como el Fe, P, Mg, Mn y en menor grado, Zn, Cu y Ca (Ray y col., 2014). En el **cuadro 3** puede observarse la composición química del frijol.

5. Fitoquímicos del frijol

Los fitoquímicos son componentes químicos o ingredientes fisiológicos activos de alimentos denominados nutraceuticos o funcionales. Los fitoquímicos del frijol tienen un

gran potencial como ingredientes funcionales y nutracéuticos, y que además poseen diversas propiedades, como antioxidantes, antihipertensivos, antidiabéticos y anticancerígenos. Los compuestos fenólicos en el frijol pueden incluir una variedad de flavonoides tales como tales como antocianinas, flavonoles, taninos, glucósidos, así como un amplio rango de ácidos fenólicos (Oomah y col., 2005).

a. Compuestos fenólicos en el frijol

Los ácidos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no calóricas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de diversas enfermedades. En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles (Quiñones y col., 2012).

Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Lin y col., 2008).

Cuadro 3. Composición química y valor nutrimental del frijol común

Característica	Contenido	Requerimiento mínimo diario
Composición química (%)		
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	
Calidad de la proteína		
Digestibilidad (%)	52-75	
Relación de la eficiencia proteínica	0.7-1.5	
Aminoácidos esenciales (g/100 g proteína)		
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
Minerales (m/100 g)		
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
Vitaminas (mg/100 g)		
Tiamina (B1)	0.86-1.14	1.5
Niacina	1.16-2.68	0.019
Ácido fólico	0.17-0.58	0.4
Anti nutricionales		
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	

Adaptado de Reyes – Moreno y Paredes-López (1993); Young y col, 1998 y Paredes- López (1998).

1) Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas. Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolito para el crecimiento y reproducción de las plantas, y además participan como agentes protectores frente a la acción de patógenos como parte de su mecanismo de defensa. Así como también presentan propiedades benéficas para la salud humana, como anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. La distribución de estos compuestos en los tejidos y células vegetales varían considerablemente, situándose en el interior de las células contenidos en la pared celular, los cuales están ligados a ella por unión tipo éster, como en el caso del ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico que han sido encontrados en la pared celular de muchas especies de plantas (Mujica y col., 2012).

Estos compuestos pueden ser liberados por la acción de enzimas hidrolíticas como las pectinasas, celulasas y las metilferulatoesterasa.

Sin embargo, existen reportes que demuestran que estos compuestos fenólicos se encuentran de manera libre en el frijol común en cantidades significativas, principalmente el ácido cafeíco y el *p*-cumárico (Atchibri y col., 2010).

2) Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano, compuesto por dos anillos fenilo, ligados a través de un

anillo de pirano heterocíclico (Martínez-Flórez y col., 2002). Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianinas y flavanoles, caracterizadas en su mayoría en frijol negro (López, 2005).

a) Antocianinas

Las antocianinas son compuestos hidrosolubles que constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo Co en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3,4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas (Montes y col., 2005).

b) Isoflavonas

Poseen un anillo bencénico lateral en posición C3. Su estructura recuerda a la de los estrógenos. Las Isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4, al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona) (Setchell y Cassidy, 1999). En

realidad, las Isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas. Las isoflavonas mayormente estudiadas son daidzeína y genisteína, a quienes les han conferido propiedades antimutagénicas (Konar y col., 2012).

3) Taninos

Ambos grupos, flavonoides y no flavonoides, se pueden encontrar formando compuestos de muy alto peso molecular, llamados, taninos. Los taninos son compuestos que no solo poseen un elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo, unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Vázquez-Flores y col., 2012). Los taninos hidrolizables se clasifican en galotaninos o elagitaninos y provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente. Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles (Díaz y col., 2010)

La estructura química de los taninos varía cualitativa y cuantitativamente en vegetales y frutas. Aunque algunos taninos son comunes en el reino vegetal, unos son característicos de alguna fruta y otros de algún vegetal en específico. Sin embargo estudios han reportado la presencia de taninos en cereales y leguminosas en menores

concentraciones (Elsadr y col., 2015). En el **cuadro 4** se describen los fitoquímicos presentes en el frijol.

6. Factores antinutricionales del frijol común

Los frijoles representan una gran fuente de proteína, que oscila entre el 20 y 30 %; sin embargo, estas presentan un bajo valor nutricional, debido a su baja digestibilidad y biodisponibilidad de los aminoácidos azufrados, factores que están relacionados con la propia estructura de la proteína, y por la presencia de factores antinutricionales implicados en la baja digestibilidad de las proteínas en el frijol. Estos factores antinutricionales pueden considerarse como una característica negativa presente en el grano de frijol. Estas sustancias pueden inhibir enzimas digestivas, dañar la mucosa intestinal o modificar los nutrientes, obstaculizando de esta manera su absorción (Doria y col., 2012). Entre los llamados factores antinutricionales podemos incluir a los oligosacáridos, como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, los cuales no son hidrolizados en la primera etapa de la digestión y terminan fermentados en ácidos grasos de cadena corta y gases en el colon, lo que provoca problemas de flatulencia. También se encuentran los taninos, que además de disminuir la digestibilidad de proteínas, limitan la biodisponibilidad de minerales como el hierro y zinc, mientras que el ácido fítico también afecta la asimilación del zinc. Por otra parte, se ha encontrado que las lectinas son proteínas que inducen el crecimiento del páncreas en ratas y producen ulceración y necrosis en el intestino (Nakitto y col., 2015).

Cuadro 4. Fitoquímicos presentes en el frijol común

Fitoquímicos	Contenido
Catequina (mg/100g bs)	61.0
Saponinas (mg/100g bs)	56.0
Antocianinas (mg/100g bs)	45.0
Quercetina (mg/100g bs)	31.0
Inhibidores de tripsina (mg/100g bs)	7.0
Ácido fítico (mg/100g bs)	3.0
Polifenoles totales (% bs)	0.10 – 0.5
p-Cumárico (µg/g bs)	5.4
Ferúlico (µg/g bs)	24.0
p-Hidroxibenzoico (µg/g bs)	10.1
Taninos (% bs)	0.0 – 0.7
Isoflavonas (mg g ⁻¹)	100 – 700
Daidzeína (mg g ⁻¹)	1 – 4
Genisteína (mg g ⁻¹)	1 – 52
Lignanós (mg g ⁻¹)	30

Bs: Base seca. Adaptado de Ocho-Anin y col (2010), Campos-Vega y col (2010).

Sin embargo, los componentes anteriormente señalados y que históricamente fueron considerados como factores antinutricionales de las leguminosas, en la actualidad se ha demostrado que están relacionados con la prevención o el tratamiento de ciertas enfermedades, sobre todo a dosis bajas cómo es posible encontrarlas en las formas habituales de preparación para su consumo, como por medio de cocción (Fabbri y Crosby, 2015).

7. Actividad antioxidante del frijol

Los compuestos fenólicos del frijol común pueden actuar como agentes antioxidantes, ya que tienen la capacidad de frenar el desarrollo de radicales libres, quelando iones metálicos o inhibiendo enzimas que están implicadas en el proceso de producción de radicales, tales como la proteína quinasa, xantina oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, glutatión oxidasa y NADH oxidasa (Halliwell, 2012).

Además de esto, también se ha reportado que los compuestos fenólicos actúan como agentes antimutagénicos, mediante la inhibición de los mutágenos potenciales, tales como las aflatoxinas, nitroarenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Frassinetti y col., 2015).

Existe una relación específica entre la estructura de los flavonoides y su actividad antioxidante, cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo en el núcleo flavanol, mayor será su actividad antioxidante (Guajardo-Flores y col., 2013).

8. Propiedades nutracéuticas de los fitoquímicos presentes en el frijol

a. Antihipertensiva

Se han reportado diversos estudios relacionados con la inhibición de ECA por parte de los compuestos fenólicos. Los extractos de fenólicos de soya mostraron inhibición de ECA *in vitro*, presentando la fracción ligada el mayor grado de inhibición (Ademiluyi y Oboh, 2013). Por otra parte, en un estudio *in vivo*, donde se administró 10 mg/kg de un extracto del flavonoide quercetina durante 5 semanas a ratas hipertensas, indujo una reducción del 21% del promedio de la presión arterial, con una reducción del 18% y 23% de la presión sistólica y diastólica respectivamente (Duarte y col., 2001). Asimismo, Suzuki y col., (2002) probaron administrar ácido ferúlico en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), obteniendo disminuciones de la presión arterial sistólica del 11%. Guzmán-Uriarte y col, (2013), prepararon una harina de frijol común bioprocesado por fermentación en estado sólido con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como un alto potencial antihipertensivo, con una inhibición de ECA del 93%.

b. Antimutagénica

La semilla de frijol también se ha asociado con actividad antimutagénica. Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los fitoquímicos presentes en el frijol actúan como antimutagénicos, y se clasifican como extracelulares e intracelulares. Respecto a los mecanismos extracelulares, incluyen la inhibición de los transportadores de proteínas situadas en la membrana externa, inhibición de la actividad del citocromo P450 al competir con el mutágeno, o la unión a receptores fuera del sitio activo que

resulta en un cambio conformacional. En cuanto a los mecanismos intracelulares incluyen la unión a moléculas distintas del ADN (lípidos y / o proteínas), la protección de sitios nucleófilos en el ADN, y la modulación de la reparación del ADN, favoreciendo la reversión o reparación del ADN dañado para mejorar la fidelidad de replicación del mismo. Se han reportado estudios desde 1999, asociados a los efectos antimutagénicos de fitoquímicos de frijol común, lo cual ha sugerido a este grano y otras leguminosas como una opción de alimento con efectos benéficos a la salud (de Mejía y col, 1999). El extracto de compuestos fenólicos de frijol común disminuyó *in vitro*, a actividad del citocromo P450, los valores reportados fueron de 48, 59 y 88% para los compuestos fenólicos, trolox y su interacción, respectivamente (Cardador-Martinez y col., 2006). Por otro lado, los extractos fenólicos (taninos y antocianinas) de distintas variedades de frijol común, redujeron la incidencia de tumores relacionados al cáncer de colon en un grupo de ratas Sprage-Dawley(Reynoso Camacho y col., 2007).

D. Fermentación en estado sólido (FES)

1. Generalidades

La fermentación se define como un proceso de biotransformación, en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos filamentosos, conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores. La fermentación influye en el alimento de diversas maneras: Enriquece la dieta ya que desarrolla una gran variedad de sabores, aromas y texturas en los alimentos, puede preservar el alimento a través de fermentaciones ácido lácticas, alcohólicas, ácido

acéticas, alcalinas y fermentaciones altas en sal, y el sustrato se enriquece con vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales. También el proceso de fermentación desintoxica los alimentos y disminuye los tiempos de cocción y utilización de energía (Mitchell y col., 2002).

A diferencia de los cultivos sumergidos donde los nutrimentos se encuentran solubilizados en un medio líquido, en los cultivos en estado sólido, el sustrato que es bioprocesado por el microorganismo se encuentra en estado sólido. La FES plantea la transformación del producto en partículas sólidas en ausencia de agua, ya que el sustrato contiene la humedad suficiente para permitir el crecimiento microbiano. Diversos microorganismos son utilizados para la FES, sin embargo debido a que la humedad se encuentra muy reducida, los hongos filamentosos son los microorganismos más utilizados (Pandey y col., 2000). Esta tecnología cuenta con diversas ventajas: Le otorga simplicidad a los medios de cultivo porque generalmente un único sustrato provee todos los nutrimentos necesarios, mayor facilidad para la obtención y aplicación del inóculo, menor volumen de fermentación, menores requerimientos de disolventes para la extracción de los productos, bajos requerimientos de energía y un riesgo muy reducido de contaminaciones bacterianas por su baja actividad de agua (Pastrana, 1996).

2. Tempe

a. Características

El tempe es un alimento fermentado típico de Indonesia, donde los hongos, particularmente el *Rhizopus spp.*, juegan un papel esencial. En términos generales, un

tempe fresco y de buena calidad es una masa compacta de materia prima, que está cubierta, penetrada y unida por micelios no esporulados del hongo. Los principales aspectos deseables del tempe son su atractivo sabor y textura, ciertas propiedades nutricionales, y la reducción del tiempo de cocción en un 50% en comparación con las semillas de soya enteras (Nout y Kiers, 2005).

b. Sustrato

Los granos de soya son la materia prima común y más popular para la fabricación de tempe, sin embargo, otras investigaciones han usado otras leguminosas como el frijol para producir tempe con características similares al producto fermentado tradicional (Randhir y Shetty, 2007).

c. Inóculo

En términos generales, los hongos y levaduras son considerados los microorganismos más adecuados para la FES. Esta selección se basa en distintas características de cultivos de hongos y levaduras, los cuales pueden crecer en condiciones de baja actividad de agua (0.5 a 0.6), mientras que los cultivos bacterianos tienen requerimientos más elevados (0.8 a 0.9) (Singhania y col., 2009). El nivel de humedad debe mantenerse en un nivel óptimo, ya que un nivel de humedad bajo, tiende a reducir la difusión de nutrientes, el crecimiento microbiano y la estabilidad de la enzima y el sustrato. Sin embargo, se han descrito diversos bioprocesamiento en estado sólido donde se utilizan cultivos bacterianos, por lo que la elección del microorganismo debe vincularse con el tipo de sustrato y el producto que se desea

obtener. Respecto a los hongos, los de tipo filamentosos son los más utilizados, gracias a su fácil adaptación, crecimiento en hifas, y su buena tolerancia a bajas actividades de agua y a condiciones de presión osmótica elevada (Steinkraus, 2002) (**Cuadro 5**).

1) *Rhizopus oligosporus*

El hongo *Rhizopus oligosporus* ha sido utilizado en Indonesia para producir tempe desde la antigüedad, y en la actualidad, el interés en este alimento se ha incrementado en todo el mundo. Durante la incubación con *R. oligosporus*, la soya se encuentra unida por un micelio blanco, formando una masa, y las enzimas liberadas por el hongo hacen al producto rico en proteínas más digeribles para los seres humanos. Las cepas de *R. oligosporus* difieren de otras cepas por tener las esporas más grandes (hasta 43 mm) y más irregulares, con los tamaños más variables. Este hongo crece rápidamente, agotando los compuestos fermentables del sustrato. También se ha informado que *Rhizopus oligosporus* presenta actividad antimicrobiana de la naturaleza glicopéptido contra cepas de *Clostridium*, *Bacillus*, y *Staphylococcus* spp (Jennessen y col., 2008).

3. Manufactura del tempe

El proceso de producción de tempe implica las siguientes etapas: limpieza, remojo, descascarillado, cocción parcial, drenado/enfriado, inoculación, colocación en contenedores, incubación y fermentación láctica.

Cuadro 5. Microorganismos utilizados para la FES

Microorganismo	Sustrato	Proceso/producto
<i>Aspergillus spp.</i>	Almidón	Enriquecimiento proteico
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de plátano Maíz Yuca Cáscara de cítricos	Proteína Koji, etanol Cinética de crecimiento Enriquecimiento proteico Cinéticas de crecimiento
<i>Aspergillus oryzae</i>	Arroz	Alcohol, aldehídos Cetonas, koji, miso
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Yuca Soya Frijol Garbanzo	Cinéticas de crecimiento Tempe Alimento proteico
<i>Rhizopus oryzae</i>	Yuca	Proteína
<i>Trichoderma viridae</i>	Salvado de trigo	Proteína, enzimas

Pandey y col (2000)

a. Limpieza / remojo / descascarillado

La limpieza del grano se realiza con el propósito de remover granos sucios, quebrados, dañados y materia extraña contaminante. El siguiente paso es llevar al grano a remojo por 12 o 15 h a temperatura ambiente, para facilitar la penetración del micelio. El crecimiento del hongo se encuentra estable a un pH mayor a 3.5 y es más lento cuando se acidifica (Dinesh y col., 2009). Ya que el hongo no puede crecer en el grano entero, se debe proceder a una etapa de descascarillado manual o por abrasión mecánica para permitir que el hongo pueda acceder a los nutrimentos del cotiledón (Roubos Van den Hil y col., 2010).

b. Cocción parcial / drenado / enfriado

El proceso de cocción puede variar desde 10 min hasta 3 h a temperatura de ebullición, esto con el fin de destruir contaminantes, bacterias interferentes, factores antinutricionales y liberar algunos nutrimentos para el metabolismo del hongo (Steinkraus, 1975). Una vez completada la cocción, el agua es descartada y los cotiledones son extendidos en bandejas, comúnmente de bambú, hojas de plátano, bolsas de plástico, mallas de alambre o cestos perforados. Se debe asegurar un correcto drenado del grano, de lo contrario el exceso de agua podría favorecer el crecimiento de microorganismos y reducir en consecuencia la vida de anaquel del producto (Winarno y Reddy, 1986).

c. Inoculación

La inoculación del sustrato se puede realizar de diversas maneras: inoculación con lote previo de tempe, inoculación con esporas de cepas puras liofilizadas o

suspendidas en agua. Para lograr una fermentación óptima se requiere la inoculación de 1×10^6 esporas/100 g del sustrato cocido (Wang y col., 1975).

d. Contenedor de FES/Incubación

Los contenedores para la fermentación deben permitir el acceso de cantidades apropiadas de oxígeno que favorezcan el crecimiento del hongo, sin promover la esporulación y el oscurecimiento del micelio. Durante esta etapa no debe existir agua superficial en contacto con el grano y la temperatura de fermentación puede ser controlada para asegurar la realización del bioproceso bajo condiciones higiénicas (Steinkraus, 1995).

Durante la incubación la temperatura (25-37°C), el tiempo de fermentación y la humedad relativa son factores importantes que deben estar sujetos a control. El incremento de la temperatura tiende a disminuir el tiempo requerido para llevar a cabo la fermentación. Se ha reportado que la humedad relativa de 60-65% es óptima para el adecuado desarrollo del hongo. Sin embargo, a valores de humedad relativa superiores al 75% se presenta una esporulación indeseable (Usmani y Noorani, 1986). **En la figura 2** se describe el procedimiento para la fermentación en estado sólido de frijol común.

4. Cambios químicos durante la producción del tempe

a. Proteínas

Se ha reportado que la FES incrementa significativamente el contenido de proteína cruda de frijol común. Este incremento puede atribuirse a la síntesis de proteína causada por la proliferación del hongo, así como a la síntesis de enzimas por

el mismo y a la reducción de las concentraciones de otros constituyentes, como lípidos y minerales (Reyes-Bastidas y col., 2010). Otros investigadores (Gibbs y col., 2004) también han informado que este bioprocesamiento aumenta el contenido de aminoácidos esenciales de granos de soya.

b. Hidratos de carbono

Los azúcares como fructosa, rafinosa y estaquiosa, localizados en la pared celular de leguminosas, son eliminados durante las etapas de remojo, cocción y fermentación. Los carbohidratos insolubles como pectina, celulosa y hemicelulosa son degradados parcialmente por las enzimas del hongo (Campos-Vega y col., 2009).

c. Lípidos

El contenido de lípidos disminuye significativamente durante la fermentación en estado sólido. Esta reducción de aproximadamente el 30%, se ha atribuido a la actividad lipolítica del hongo, la cual permite el uso de estos componentes como fuente de energía, teniendo preferencia por el ácido α -linolénico. Durante las primeras 24 h de fermentación el hongo provoca la mayor parte de la hidrólisis y consumo de lípidos. Sin embargo, existen estudios que han obtenido un ligero aumento del contenido de lípidos después de la FES, que se ha atribuido a la disociación de complejos lipoproteícos y a la síntesis de lípidos propios del microorganismo durante su crecimiento en el sustrato (Reyes-Moreno y col., 2004).

d. Vitaminas y minerales

Wagenknecht y col. (1961), reportaron que la FES incrementó dos veces el contenido de riboflavina, siete veces el contenido de niacina y 33 veces la actividad de la cobalamina. Por otro lado, la tiamina disminuye por el efecto térmico del tratamiento y el tiempo de fermentación. Kao y Robinson (1978) también informaron que las vitaminas solubles, con excepción de la tiamina, sufren un incremento en tempe de garbanzo. Otros investigadores (Reyes-Bastidas, 2008) han reportado que la FES disminuye el contenido de cenizas garbanzo de 3.14 % a 1.98%.

Esta reducción podría atribuirse a la etapa de remojo en medio ácido, donde ocurre lixiviación de electrolitos y pérdida de sólidos y a la etapa de cocción en medio ácido, donde se presenta una liberación parcial de calcio y magnesio al medio de cocción.

5. Efecto de la FES sobre el valor nutricional del sustrato

a. Valor biológico de las proteínas

Durante la FES se presenta un incremento significativo en el valor biológico de las proteínas, como consecuencia de la proliferación y actividad metabólica del hongo y de la reducción de las concentraciones de lípidos y minerales (Ikasari y Mitchell, 1994).

b. Digestibilidad

Durante la FES, la hidrólisis de proteínas realizada por proteasas excretadas por el hongo y la eliminación de factores antinutrientales, durante las etapas iniciales del proceso, contribuyen al incremento de la digestibilidad del grano bioprocesado. Los taninos interfieren con la solubilidad de las proteínas y disminuyen su valor nutricional,

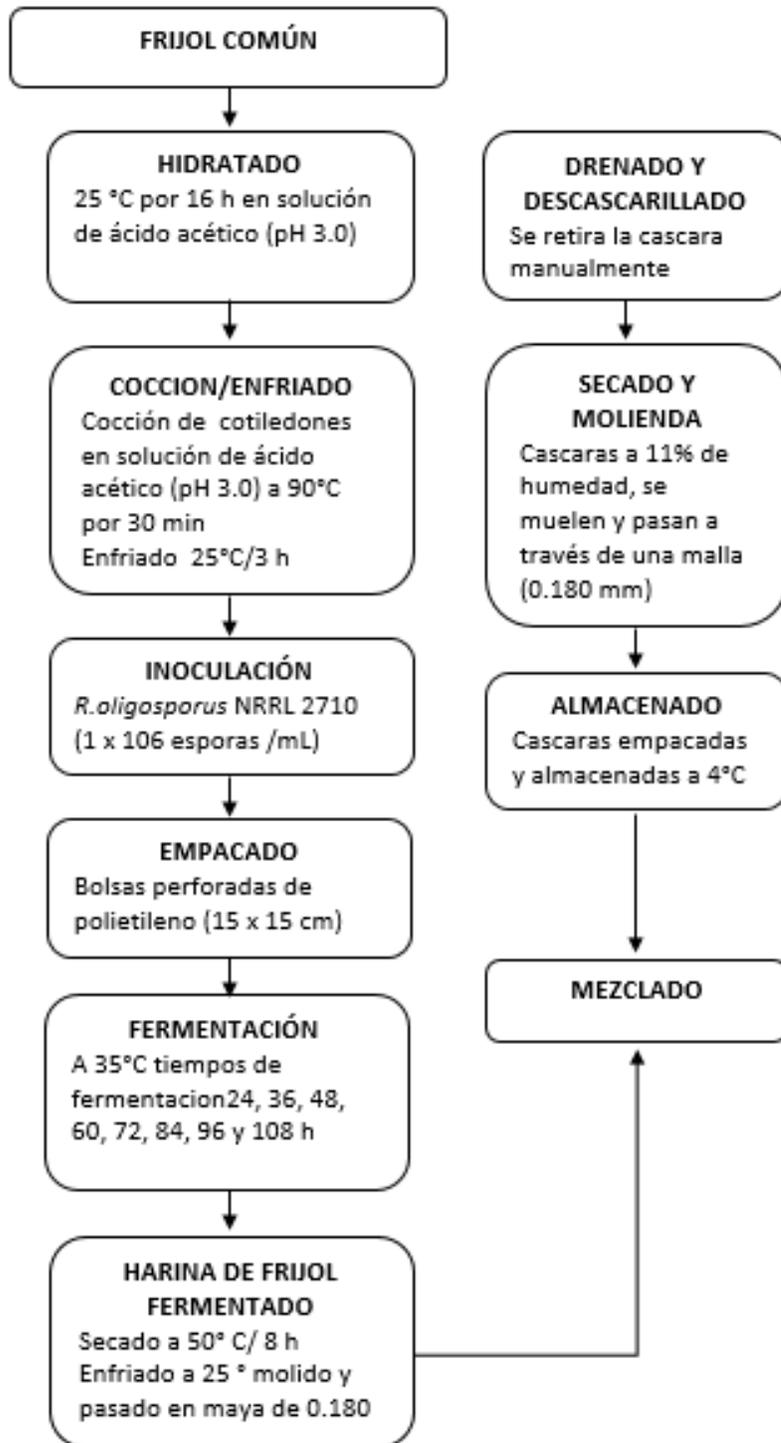


Figura 2. Fermentación en estado sólido de frijol común. Reyes-Moreno (2004), modificado por Guzmán-Uriarte y col. (2013).

por lo que es importante su reducción para incrementar el valor nutricional del producto fermentado (Reyes-Moreno y col., 2000).

c. Perfil de aminoácidos

El frijol común es considerado una fuente rica de lisina. El contenido de este aminoácido aumenta durante el bioprocesamiento, debido a que ocurre un incremento de proteínas de alto valor biológico y una reducción de los taninos, que podrían interactuar con las proteínas disminuyendo la lisina disponible del grano (Frias y col., 2007). En el **cuadro 6** se describe el efecto de la FES sobre la composición química y valor nutrimental de leguminosas.

6. Efecto de la FES sobre perfiles fitoquímicos

Cheng y col. (2013) reportaron que *R. oligosporus* tiene potencial para incrementar significativamente el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frijol negro. Estos investigadores observaron que la actividad de β -glucosidasa aumentó con el tiempo de fermentación, lo cual resultó en la acumulación de agliconas fenólicas (**Cuadro 7**).

7. Efecto de la FES sobre propiedades nutraceuticas de los fitoquímicos presentes en el sustrato

a. Capacidad antihipertensiva

Se ha reportado que los compuestos fenólicos aumentan durante la FES, confiriéndole propiedades antihipertensivas al producto, ya sea por sus propiedades antioxidantes (Kozuma y col., 2005) o por la inhibición de la ECA al competir por el sitio activo (Actis-Goretta y col., 2003). Guzmán-Uriarte y col. (2013), reportaron que la FES

incrementó el potencial antihipertensivo de frijol común. Resultados similares fueron reportados por Rochín-Medina y col. (2015). Esta actividad fue atribuida a la hidrólisis parcial de péptidos durante la fermentación.

b. Capacidad Antimutagénica

Hung y col. (2007) evaluaron el efecto antimutagénico de soya negra fermentada por *aspergillus awamori*. El extracto de soya bioprocesada exhibió diversos grados de inhibición de la actividad mutagénica de 4-nitroquinolina-N-óxido (un mutágeno directo) y Benzo[a]Pireno (un mutágeno indirecto) en cepas de *S. typhimurium*, con un 92% y 89% de inhibición para cada mutágeno, respectivamente.

Las actividades antimutagénicas relativamente altas observadas en los extractos de soya negra fermentada, se asoció con los contenidos más altos de compuestos fenólicos totales, antocianinas y agliconas. Los glucósidos flavonoides son menos antimutagénicos que las agliconas correspondientes tales como la daidzeína, genisteína y gliciteína (Edenharder y Tang, 1997).

Los hongos son capaces de producir β -glucosidasa, que promueve la escisión del enlace β -glicosil en los glucósidos de isoflavonas de leguminosas para formar agliconas (Lee y col., 2008) promoviendo su incremento. Por lo tanto, estos cambios pueden conducir a una actividad antimutagénica mejorada. Sin embargo, la formación de otros compuestos bioactivos y el aumento de contenido de ácido linoléico en sustratos fermentados, según lo informado por Park y col. (2003), también puede contribuir al incremento de esta actividad.

Cuadro 6. Efecto de la fermentación en estado sólido sobre la composición química y valor nutrimental de leguminosas

	Frijol		Garbanzo	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
Composición química				
Carbohidratos	70.83	68.37	64.6-69.8	64.53-69.3
Proteína (% bs)	22.76	29.98	19.7	25.7
Lípidos (% bs)	2.53	1.51	6.1	2.6
Almidón resistente (g/100g, bs)	2.40	5.57	1.9	7.6
Fibra dietaria total	16.02	35.83	21.64-27.64	29.76-34.1
Nutricional				
Aminoácidos esenciales				
Histidina	2.41	2.59	2.43	2.54
Isoleucina	3.08	3.32	3.19	3.56
Leucina	7.20	7.19	7.14	7.22
Lisina	6.50	6.30	6.39	6.09
Metionina + Cisteína	2.14	2.55	2.18	2.59
Fenilalanina + Tirosina	8.50	9.19	8.80	9.87
Treonina	3.50	3.75	3.46	3.85
Triptófano	1.36	1.29	1.10	1.06
Valina	3.51	3.70	3.54	3.76
Total	38.2	39.88	38.23	40.5
Digestibilidad in vitro (%)	72.2	83.2	69.25	75.14
Digestibilidad in vivo (%)				
Aparente	81.10	86.20	-	-
Verdadera	83.70	88.80	-	-

Adaptado de Angulo-Bejarano y col., 2008; Reyes-Moreno y col.2008; Rochín-Medina y col (2015).

Cuadro 7. Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los niveles de fitoquímicos en leguminosas

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

Adaptado por Sánchez-Magaña (2014).

V. JUSTIFICACIÓN

El frijol contiene una excelente variedad de nutrimentos que se han relacionado con un menor riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas. Estas propiedades se han asociado a fitoquímicos presentes en el grano. La fermentación en estado sólido (FES) es un bioproceso que mejora las características nutricionales y nutraceuticas de leguminosas, y podría utilizarse en el bioprocesamiento de frijol común para obtener un alimento funcional con alto potencial antihipertensivo y antimutagénico *in vivo* e *in vitro*, que podría ser utilizado para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas consideradas la principal causa de mortalidad en México y el mundo.

VI. HIPÓTESIS

Las harinas de frijol común bioprocesado por fermentación en estado sólido, tienen mayor potencial antihipertensivo y antimutagénico que las harinas de frijol común sin procesar.

VII. OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Demostrar el incremento del potencial antihipertensivo (*in vitro* e *in vivo*) y antimutagénico (*in vitro*) de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) Azufrado Higuera y Negro Jamapa por efecto de la fermentación en estado sólido (**FES**).

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar el efecto de la **FES** sobre el potencial antihipertensivo *in vitro* de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa.
- 2) Conocer el efecto de la **FES** sobre el potencial antihipertensivo *in vivo* de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa en ratas espontáneamente hipertensas.
- 3) Determinar el efecto de la **FES** sobre el potencial antimutagénico *in vitro* de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa contra el mutágeno 1-nitropireno en *Salmonella typhimurium*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Como material de estudio se utilizó frijol común (*Phaseolus vulgaris L*) variedad Azufrado de Higuera y Negro Jamapa. Los granos fueron limpiados y almacenados en recipientes de plástico, cerrados herméticamente a 8-10°C hasta su posterior uso. Para la FES se utilizó la cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 proporcionada por American Type Culture Collection, Manassas, USA.

B MÉTODOS

1. Preparación de harina de frijol común bioprocesada (HFCB)

Se utilizó el procedimiento de Guzmán-Uriarte y col. (2013) y Sánchez-Magaña y col. (2014) con modificaciones.

a. Preparación del sustrato

Como sustrato se utilizó frijol común, variedades Azufrado de Higuera y Negro Jamapa. Lotes de 200 g de granos enteros fueron remojados por 8 h en agua destilada. Después del remojo, la testa fue removida manualmente, secada y almacenada a 4°C. Los cotiledones luego fueron sometidos a cocción a 90°C por 30 min en disolución acuosa de ácido acético glacial (pH 3) relación 1:3 (p/v). Finalmente los cotiledones se drenaron y secaron superficialmente a temperatura ambiente.

b. Inóculo

La cepa liofilizada NRRL 2710 de *Rhizopus oligosporus* se propagó en agar 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. Para determinar el número de esporas (1×10^6 /mL) se utilizó el método de McFarland (Leptospira LABORATORY 1997), una vez preparada la suspensión, se midió absorbancia para determinar el número de esporas suspendidas.

c. Fermentación

Lotes de 100 g cotiledones cocidos fueron inoculados con 3 mL de la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) y colocados en bolsas de polietileno de 15 x 25 cm con perforaciones de 0.5 mm hechas cada 4 cm. Las condiciones optimizadas de FES obtenidas previamente (León-Murillo, 2016; Rochín-Medina y col., 2015) para frijol común Azufrado Higuera (33.5°C, 108h) y Negro Jamapa (38°C, 100h) se aplicaron en el proceso de fermentación. Los frijoles bioprocesados (tempes) fueron secados (50°C / 8 h), enfriados (25°C), molturados y mezclados con sus testas molturadas, para obtener las harinas de frijol común bioprocesado (HFCC), las cuales fueron finalmente empacadas y refrigeradas a 4°C en recipientes sellados hasta su uso.

2. Obtención de los extractos fenólicos de HFCC y HFCCB

a. Extracción de fenólicos libres

Se utilizó el procedimiento descrito por Adom y Liu (2002) para la obtención de extractos libres. Se realizó una doble extracción de los fitoquímicos libres a partir de 25 g de muestra con 100 mL de etanol al 80% (v/v), se agitaron en un agitador (OVAN

noría R, EUA, 2010) a velocidad 125 por 1 h, se centrifugó a 5000 xg/10°C durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un tubo cónico a 45°C a presión baja y se almacenó a 4°C hasta su uso. El precipitado se utilizó para la obtención del extracto de fitoquímicos ligados.

b. Extracción de fenólicos ligados

La extracción de fitoquímicos ligados se realizó de acuerdo a la metodología de Adom y Liu (2002). Al precipitado se agregaron 100 mL de hexano para la remoción de lípidos, se centrifugó a 5000 xg a 10°C por 10 min y se extrajo el hexano. Posteriormente, se digirió con 100 mL de NaOH 2 M, se eliminó el oxígeno en presencia de N₂ gaseoso y se sometió a tratamiento térmico, en baño maría a 95°C por 30 min. Luego se agitó por 1 h a 25°C. La mezcla se neutralizó con 20 mL de HCL concentrado, se agitó por 10 min. Finalmente, se agregaron 100 mL de acetato de etilo, se agitó por 1 h y se centrifugó nuevamente a 5000 xg a 10°C por 10 min, luego se extrajo el acetato de etilo. Los compuestos que se extrajeron se concentraron hasta la sequedad para su almacenamiento.

3. Determinación de la actividad antihipertensiva de HFCC y HFCB

a. Ensayos *in vitro* para determinar actividad inhibitoria de la ECA

La inhibición de la ECA se determinó mediante el kit ACE Kit-WST (A502-10), que se basa en la detección colorimétrica de ácido 3-hidroxi-butílico (3HB) generado a partir del 3-hidroxi-butilil-Gly-Gly-Gly (3HB-GGG). La ECA hidroliza Gly-Gly, generando 3-hidroxi-butilil-Gly; posteriormente, por acción de una aminoacilasa, se obtiene ácido 3-hidroxi-butílico, el cual próximamente se hace reaccionar con una solución indicadora.

En una microplaca se agregaron 20 µL del extracto a evaluar, posteriormente se agregó el sustrato 3HB-GGG y la ECA, además de un blanco 1 (sin muestra) y un blanco 2 (sin muestra ni solución enzimática). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 h en una incubadora y posteriormente se agregaron 20 µL de la solución indicadora. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente y enseguida se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm en un lector de microplacas.

Para determinar el porcentaje de inhibición se preparó una curva de inhibición utilizando la concentración de la muestra para el eje X y el porcentaje de inhibición de ECA para el eje Y, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = \frac{Abs_{blanco1} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco1} - Abs_{blanco2}} \times 100$$

A partir de los porcentajes de inhibición obtenidos, se calcularon valores de **IC₅₀** [concentración de extracto necesario para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); entre más pequeño el valor de **IC₅₀** mayor potencial inhibitorio de la actividad de la enzima tendrá el extracto].

b. Ensayos *in vivo* para determinar capacidad antihipertensiva

El potencial antihipertensivo de la harina de frijol fermentado se determinó mediante la metodología de Fritz y col. (2011) con ligeras modificaciones. Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron en condiciones estándar (23°C, ciclos de 12 h de luz-oscuridad, consumo de agua *ad-libitum*), con un acondicionamiento previo al experimento de 12 h de ayuno. Se trabajó con ocho grupos de seis ratas cada uno, al grupo control positivo se le

suministró medicamento comercial (Captopril), un grupo control negativo (placebo) y seis grupos en los que se utilizaron diferentes dosis de extractos libres y ligados secos de compuestos fenólicos (50, 150, 250 y 500 mg/kg) administrados vía reto intragástrico. La presión arterial se midió a diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 h) posterior a la administración del suplemento. Se utilizó el equipo CODA tail cuff blood pressure system de Kent Scientific para la medición de la presión arterial. Se determinó el promedio de 25 mediciones y los resultados se expresaron como disminución de la presión sistólica [Δ PAS (mmHg)] utilizando la siguiente fórmula:

$$[\Delta\text{PAS (mmHg)}] = (\text{Presión sistólica})_{t=n} - (\text{Presión sistólica})_{t=0}$$

4. Determinación de la actividad antimutagénica *in vitro* de HFCC y HFCEB

Para la evaluación de la actividad antimutagénica, se utilizó el ensayo propuesto por Ames y col (1973), con cepas YG1024 de *S. typhimurium* y el mutágeno 1-nitropireno. La concentración elegida de fenólicos fue de 250 $\mu\text{g/pocillo}$, para disolverse en DMSO. Se descongelaron cultivos de la cepa mutada mantenidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se incubaron en medio de cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 horas para reactivar la bacteria. Una vez finalizado el proceso de incubación, la bacteria se llevó a centrifugación a 4500 rpm a 4°C por 10 min. Después de retirar el sobrenadante, se agregaron 2 mL de PBS para medir la absorbancia de la bacteria a 550 nm, para determinar la cantidad de PBS restante. Se acondicionaron tubos de ensayo en hielo, a los cuales se agregaron 90 μL de cóctel. Después se agregaron 30 μL de la bacteria a cada tubo del tratamiento a evaluar, incluido un control positivo y un control negativo. Al control positivo se agregaron 10 μL de DMSO además de 5 μL de 1-nitropireno, al

control negativo 15 μ L de DMSO y se agregaron 10 μ L del extracto a evaluar en los tubos correspondientes a cada tratamiento. Los tubos se llevaron a incubación a 37°C por 90 min. Finalizada la reacción, se añadió 2 mL de agar superficie con solución histidina/biotina al 10% a cada tubo, los cuales inmediatamente se vertieron sobre cajas petri con agar esterilizado.

El ensayo se realizó en triplicado, identificando el número de colonias revertidas después de la incubación realizada por 48 h. A partir de los ensayos realizados, se determinó la toxicidad/mutagenicidad de los extractos fenólicos y la actividad antimutagénica. El índice de mutagenicidad (IM) se calculó como la razón entre el número de revertantes inducidas por la sustancia evaluada y el número de revertantes espontaneas. La muestra evaluada es considerada mutagénica si $IM \geq 2$ y citotóxica si $IM \leq 0.6$. La actividad antimutagénica se calculó como porcentaje de inhibición de actividad mutagénica (PI): $PI = (1 - y_1/y_2) \times 100$; donde, y_1 =número de revertantes por plato en presencia de la muestra evaluada (antimutágeno), y y_2 =número de revertantes por plato en ausencia de la muestra evaluada (antimutágeno).

La antimutagenicidad se clasificó de acuerdo a la escala propuesta por Wall y col (1988) de PI: 0–20% negativa, 20–40% débil, 40–60% positiva, 60–90% fuerte, >90% sospecha de toxicidad.

5. Análisis estadístico

Los resultados de las actividades antihipertensiva y antimutagénica fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, seguido por comparación de medias aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 5%. Para analizar el efecto del tiempo post-administración de los extractos fenólicos sobre la presión arterial sistólica en REH se aplicó una prueba t Student para muestras pareadas con una $p \leq 0.05$.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Potencial antihipertensivo de harinas de frijol común variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa crudo y bioprocesado

1. Potencial antihipertensivo *in-vitro* (inhibición de ECA por extractos fenólicos de HFCC y HFCB)

En el **Cuadro 8** se presentan los valores de potencial inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (potencial antihipertensivo), el cuál fue expresado como IC_{50} [concentración de extracto necesario para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); entre más pequeño el valor de IC_{50} mayor potencial inhibitorio de la actividad de la enzima tendrá el extracto], de extractos fenólicos hidrofílicos de harinas de frijol común correspondientes a las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. En **Cuadro 8** también se presentan los valores de porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los extractos fenólicos a diferentes concentraciones. Estos valores de porcentaje de inhibición son mostrados como una curva sigmoideal dosis-respuesta en las **Figuras 3 y 4**, los cuales fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill's. Los valores de R^2 obtenidos de la regresión no lineal fueron de 0.85 a 0.93, lo cual significa que los datos de porcentaje de inhibición se ajustaron adecuadamente a la ecuación de Hill's. El hecho de que los datos de porcentaje de inhibición de ECA se ajustaran adecuadamente a un comportamiento sigmoideal significa que el efecto de los extractos fenólicos estudiados en esta investigación sobre esta respuesta se comportó de una manera dosis – dependiente.

Cuadro 8. Valores de IC_{50} y porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en extractos fenólicos de frijol común.

Grupos	PI (%)							IC_{50} (mg/mL)
	1	1/5	1/5 ²	1/5 ³	1/5 ⁴	1/5 ⁵	1/5 ⁶	
Concentración								
Azufrado Higuera								
Frijol crudo								
Fracción libre	87.51	82.07	79.55	41.59	30.21	4.43	7.55	0.7
Fracción ligada	86.90	62.73	52.16	35.95	31.82	30.41	24.77	0.8
Frijol bioprocesado								
Fracción libre	96.27	82.37	47.23	14.50	11.68	-13.49	-26.38	0.18
Fracción ligada	86.9	62.73	52.16	35.95	31.82	30.41	24.77	0.33
Negro Jamapa								
Frijol crudo								
Fracción libre	84.19	77.09	49.07	30.04	18.54	10.46	12.79	0.89
Fracción ligada	96.58	89.13	57.79	44.40	41.71	25.55	39.2	0.56
Frijol bioprocesado								
Fracción libre	94.97	94.25	80.87	68.83	43.96	25.81	16.38	0.49
Fracción ligada	92	91.46	68.65	36.95	27.07	17.91	15.13	0.33

PI: Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

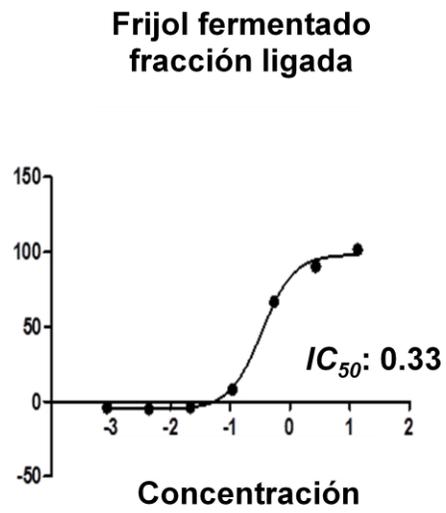
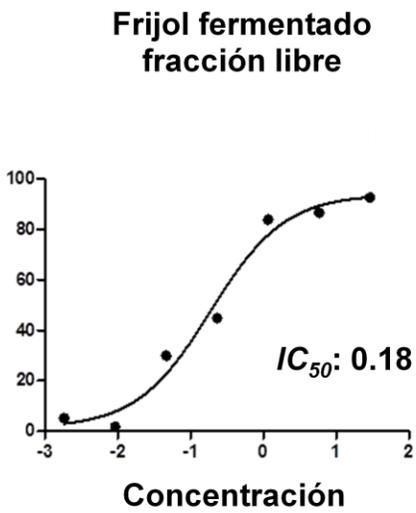
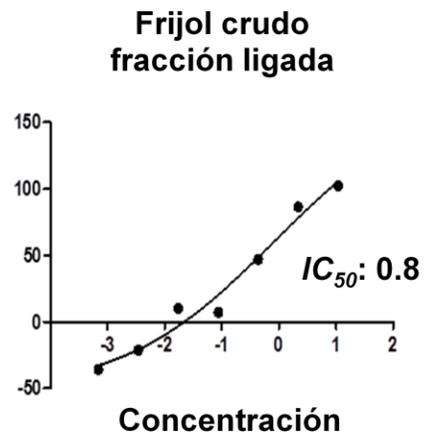
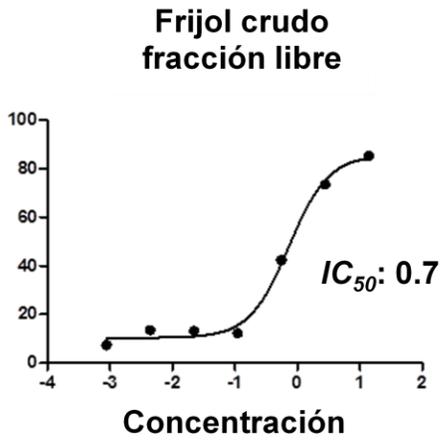
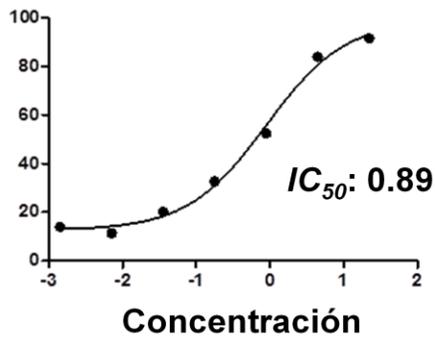
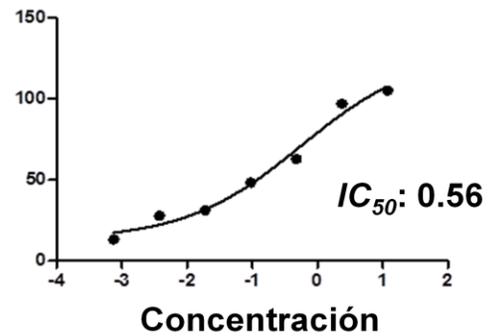


Figura 3. Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición respecto a diferentes dosis evaluadas de extractos fenólicos de frijol común variedad Azufrado Higuera crudo y bioprocesado.

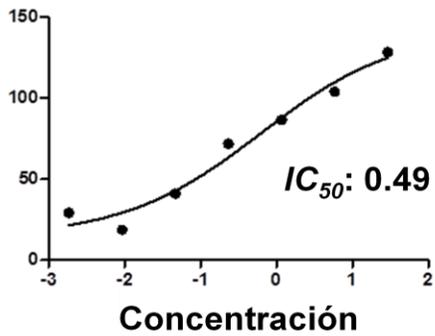
**Frijol crudo
fracción libre**



**Frijol crudo
fracción ligada**



**Frijol fermentado
fracción libre**



**Frijol fermentado
fracción ligada**

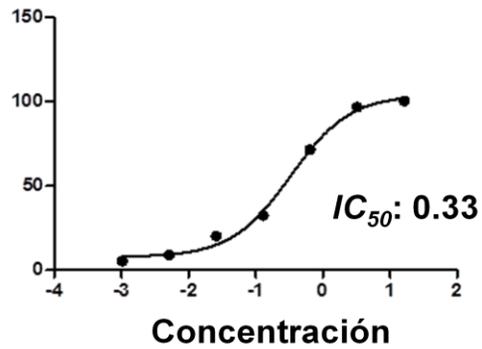


Figura 4. Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición respecto a diferentes dosis evaluadas de extractos fenólicos de frijol común variedad Negro Jamapa crudo y bioprocesado.

Posteriormente, a partir de la regresión se calcularon los valores de IC_{50} . Los extractos fenólicos mostraron los siguientes valores de IC_{50} : Para la variedad Azufrado Higuera, 0.7 y 0.8 mg/mL para los extractos libres y ligados de frijol crudo, respectivamente, y 0.18 y 0.33mg/mL en extractos libres y ligados de frijol bioprocesado, respectivamente; para la variedad Negro Jamapa, 0.89 mg/mL en la fracción libre y 0.56 mg/mL en la fracción ligada para el frijol crudo, y 0.49 mg/mL en la fracción libre y 0.33 mg/mL en la fracción ligada del frijol bioprocesado.

En el **Cuadro 9** se muestra el análisis de varianza de los datos de IC_{50} . Se puede observar que solamente el efecto principal de la variable independiente **proceso** fue significativo ($p < 0.05$) para la respuesta IC_{50} . Los efectos principales de las variables **variedad de frijol** y **extracto**, así como, las interacciones **proceso * variedad de frijol**, **proceso * extracto**, **variedad de frijol * extracto** y **proceso * variedad de frijol * extracto** fueron no significativos ($p > 0.05$) para esta variable de respuesta. Sin embargo, cuando los términos no significativos ($p > 0.05$), mencionados anteriormente, fueron eliminados en el análisis de varianza, los resultados mostraron que además del efecto principal de la variable **proceso** también el efecto de la interacción **variedad de frijol * extracto** fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (**Cuadro 10**). En la **Figura 5** se observa que estos dos términos significativos explicaron el 90.45% de la variación total de la variable IC_{50} . También, se puede ver que el efecto principal de la variable **proceso** fue la que presentó la mayor contribución (75%) a la variación total de la respuesta IC_{50} .

Cuadro 9. Efecto del proceso, variedad y tipo de extracto sobre el valor de IC_{50} .

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.43	6	0.072	40.22	0.1201
A:PROCESO	0.33	1	0.33	182.25	0.0471*
B:VARIEDAD	8.450E-003	1	8.450E-003	4.69	0.2753
C:EXTRACTO	7.200E-003	1	7.200E-003	4.00	0.2952
AB	0.016	1	0.016	9.00	0.2048
AC	6.050E-003	1	6.050E-003	3.36	0.3179
BC	0.068	1	0.068	38.03	0.1023
RESIDUOS	1.800E-003	1	1.800E-003		
TOTAL (CORREGIDO)	0.44	7			

Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

Cuadro 10. Efecto del proceso y la interacción variedad * extracto sobre el valor de *IC*₅₀.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.40	2	0.20	24.97	0.0025**
A:PROCESO	0.33	1	0.33	41.32	0.0014**
BC	0.068	1	0.068	8.62	0.0324*
RESIDUOS	0.040	5	7.940E-003		
TOTAL (CORREGIDO)	0.44	7			

Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

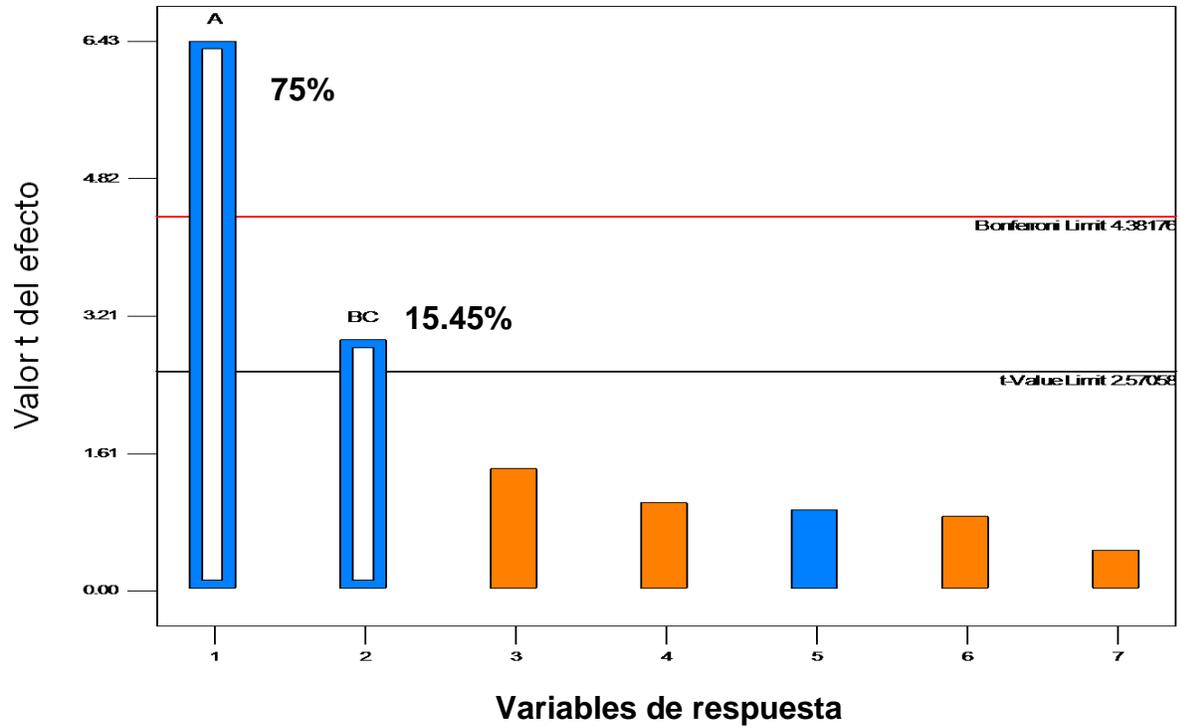


Figura 5. Diagrama de Pareto de los efectos principales e interacciones. A: *Proceso*, BC: Interacción *variedad de frijol * extracto* sobre el valor de IC_{50} .

En la **Figura 6** se reporta el efecto principal gráfico de la variable **proceso**. En la figura se aprecia que los valores más bajos de **IC₅₀** correspondieron a las harinas de frijol bioprocesado por FES independientemente de la variedad de frijol y el tipo de extracto empleados. Esto significa que, el bioproceso de FES mejoró sustancialmente el potencial antihipertensivo de los extractos fenólicos hidrofílicos del frijol común, en las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. En la **Figura 7** se muestra el efecto de interacción **variedad de frijol * extracto**. En la figura se observa que para la variedad de frijol Azufrado Higuera el extracto libre presentó el menor valor de **IC₅₀**, mientras que, para la variedad de frijol Negro Jamapa el extracto ligado presentó el menor valor de **IC₅₀**, tanto en las muestras de frijol crudo como bioprocesado.

Los valores de **IC₅₀** obtenidos en esta investigación de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de harinas de frijol común (0.56-0.89mg/mL) fueron más altos que los resultados reportados por Ademiluyi y Oboh (2013) para extractos fenólicos libres y ligados de soya (0.143-0.160 mg / mL). Sin embargo, en esta investigación ellos emplearon acetona al 80% para la extracción de fenólicos libres, lo que aunado a la diferencia en el material empleado (soya), pueden explicar de alguna forma la diferencia en los resultados de **IC₅₀** reportados por estos investigadores y los valores encontrados en la presente investigación. No existen reportes en la literatura acerca de los valores de **IC₅₀** para la actividad inhibitoria de ECA de extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de harinas de frijol común. Asimismo, existen muy pocos reportes acerca del efecto inhibitorio de extractos fenólicos de granos sobre la actividad de ECA.

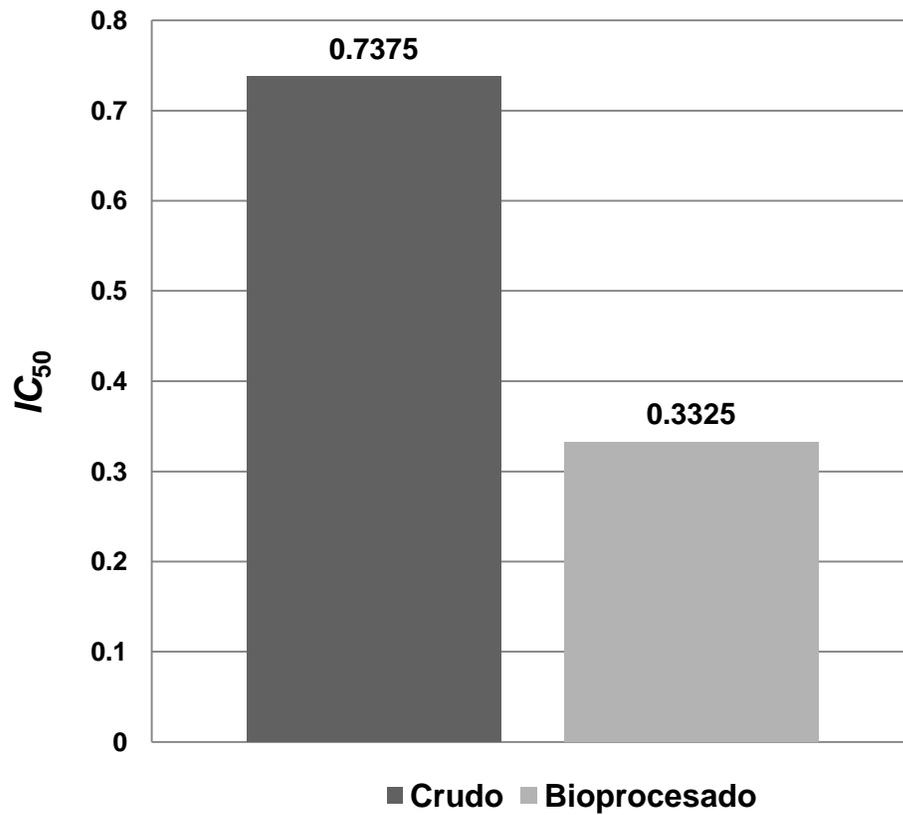


Figura 6. Efecto principal de la variable *proceso* sobre el valor de IC_{50} .

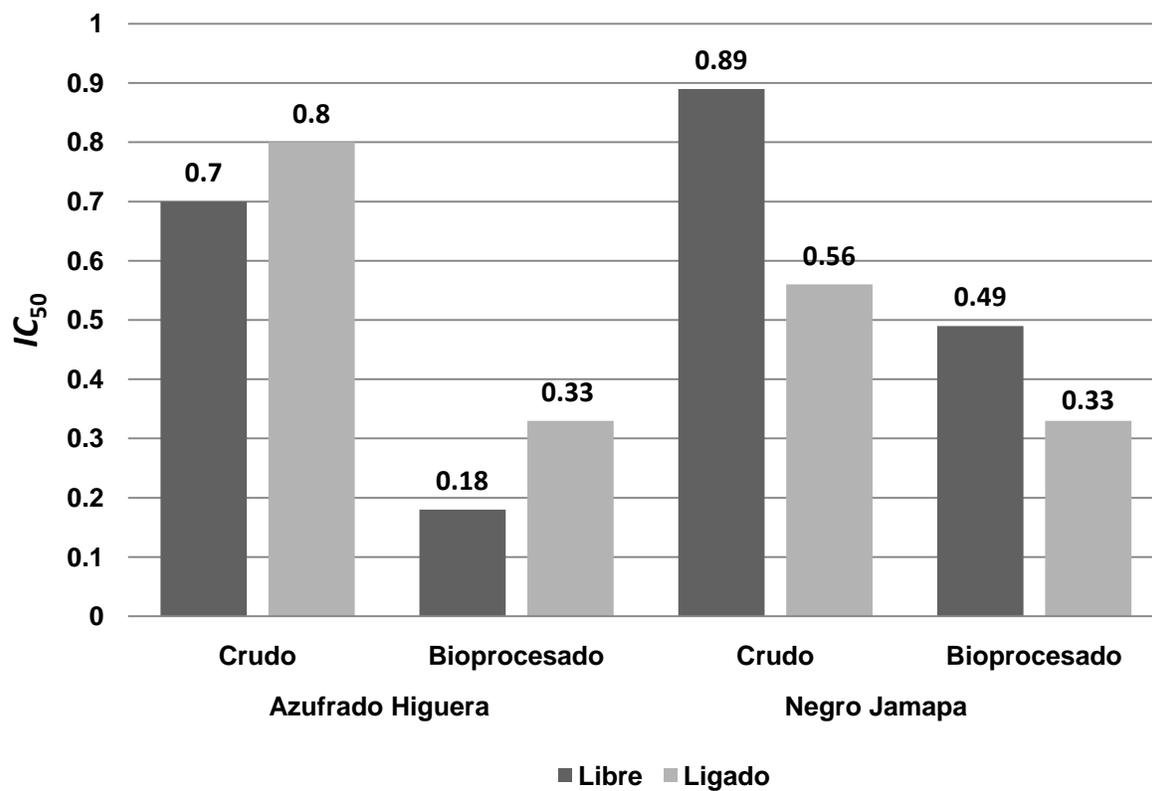


Figura 7. Efecto de la interacción *variedad de frijol* * *extracto* sobre el valor de IC_{50} .

El efecto sobre la actividad antihipertensiva [aumento de la actividad inhibitoria de ECA (disminución del valor IC_{50})] tras la fermentación en estado sólido con el hongo *R. oligosporus* también fue reportada por McCue y col (2005) en extractos acuosos de soya. Ellos encontraron que estos extractos de soya tuvieron actividad inhibitoria significativa sobre ECA. Sin embargo, en esta investigación se reportó que el bioprocesamiento de la soya por *R. oligosporus* no tuvo ningún efecto en mejorar o reducir aún más la inhibición de ECA. Este resultado reportado por estos investigadores difiere de lo encontrado en el presente trabajo de investigación, ya que los extractos fenólicos hidrofílicos de frijol común bioprocesado con *R. oligosporus* tuvieron un efecto inhibitorio de ECA significativamente mayor que en los extractos del frijol sin procesar. Esto puede deberse a las diferencias en el tipo de material, tipo de extracto y condiciones de FES empleadas.

El efecto inhibitorio de ECA *in vitro* e *in vivo* ha sido documentado a partir de compuestos aislados de algunos alimentos como chocolate, café, té verde, entre otros, particularmente glucósidos fenólicos como quercetina, miricetina y kaempferol (Basu y Lucas 2007; Diebolt y col 2001). Existen diferentes hipótesis sobre el mecanismo de inhibición a partir de estos compuestos. Se describe que su estructura fenólica tiene un mecanismo de inhibición competitiva, alterando su función por aglutinación (Arenas y col 2009). En otros estudios se ha demostrado una inhibición no competitiva de la actividad *in vitro*, es decir, tanto el sustrato como el inhibidor se unen a la enzima simultáneamente y de forma reversible. Por otro lado, Al Shukor y col (2013) probaron que el efecto inhibitorio puede explicarse por el secuestro del Zn^{2+} ; esto se probó por la teoría de que la ECA es una metaloproteinasas dependiente de Zn^{2+} , y que los

compuestos quelantes de metales no específicos también pueden presentar un efecto inhibitorio de ECA. También se destaca el hecho de que los grupos hidroxilo presentes en los compuestos fenólicos establecen una interacción tipo puente de hidrógeno con ciertas secuencias ricas en prolina presentes cerca del sitio activo de la ECA (Kaushik y Bhat 2003; Simon y col 2003).

Por otro lado, la investigación de la estructura física de la enzima convertidora de la angiotensina I humana que es homóloga a la de ECA de conejo reveló la presencia de cuatro grupos de cisteína en la proteína, tres de los cuales están cerca o existen en la superficie de la molécula y poseen puentes disulfuro (McCue y col, 2005). La acción inhibitoria de los extractos fenólicos libres y ligados también puede deberse a las interacciones entre los fenólicos y los puentes disulfuro (cisteínas oxidadas) que residen en la superficie de la ACE, causando ligeras modificaciones en la estructura de la enzima, y posiblemente traducándose esto en una inhibición enzimática (McCue y col, 2005; Ademiluyi y Oboh, 2013).

Respecto a la actividad inhibitoria de los extractos fenólicos libres y ligados de las harinas de frijol común podemos decir que su naturaleza hidrofílica favorece la interacción directa con la enzima en la fase acuosa lo cual puede ser responsable de la inhibición de ECA (Ademiluyi y Oboh, 2013). Por lo tanto, el carácter hidrofílico del tipo de compuestos fenólicos presentes en cada una de los extractos (libres y ligados) posiblemente definirá la actividad inhibitoria sobre la actividad de ECA. En la presente investigación se encontró que el extracto libre de las harinas de frijol común de la variedad Azufrado Higuera presentó una mayor actividad inhibitoria de ECA, mientras

que, el extracto ligado de la variedad Negro Jamapa fue el que presentó mayor potencial de inhibición de ECA.

El incremento de la actividad inhibitoria de la actividad de ECA durante el bioprocesamiento de frijol común a través de FES podría ser explicada por la liberación de fitoquímicos con actividad biológica tales como compuestos fenólicos con capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); con ello se reduce la actividad de angiotensina II e incrementan los niveles de bradiquinina, lo que resulta en una disminución de la presión arterial. La FES es el bioprocesamiento microbiano de un sustrato alimenticio sólido que actúa como un soporte físico y una fuente de nutrientes en presencia de un contenido de líquido libre bajo. La FES aumenta el contenido fenólico de las semillas procesadas con hongos, lo que mejora la funcionalidad potencial relevante para la salud de estos alimentos (Rochín-Medina y col, 2015; Sánchez-Magaña y col, 2014; Torino y col, 2013). La mejora de la actividad antihipertensiva de los alimentos fermentados a base de granos durante la FES puede deberse al aumento de los compuestos fenólicos y los flavonoides llevados a cabo por la hidrólisis enzimática de los hongos (Rochín-Medina y col, 2015; Sánchez-Magaña y col, 2014; Torino y col, 2013). 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 β -glucosidasa se ha descrito ampliamente como una enzima responsable de catalizar la hidrólisis de los enlaces β 1-4 alquil y aril- β -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 β -glucosidasa aumentaba con el tiempo de fermentación y daba como resultado la acumulación de agliconas fenólicas.

Se ha reportado en literatura que los inhibidores de ECA naturales aislados a partir de granos como las leguminosas, se pueden usar como productos farmacéuticos y suplementos alimenticios fisiológicos funcionales para la terapia de hipertensión.

En el estudio de compuestos con acción antihipertensiva es necesario primero comprobar los efectos *in vitro* y posteriormente *in vivo*, debido a que algunos compuestos que muestran alguna actividad biológica *in vitro*, pueden metabolizarse *in vivo* y convertirse en metabolitos inactivos, es decir, pasar de compuestos activos a compuestos inactivos, así como también algunos extractos muestran solo actividad *in vivo*, es decir compuestos inactivos se convierten gracias al metabolismo en compuestos con efecto biológico.

2. Potencial antihipertensivo *in-vivo* (Análisis del efecto de extractos fenólicos de HFCC y HFCEB sobre la presión arterial sistólica (PAS) en ratas espontáneamente hipertensas)

En este bioensayo se evaluó el efecto agudo de extractos fenólicos de HFCC y HFCEB en ratas espontáneamente hipertensas (REH), es decir, se administraron diversas concentraciones de los extractos (dosis=50,150, 250 y 500 mg/kg) y se registraron las PAS a diferentes tiempos (1.5, 3, 4.5 y 6 h) después de la administración

del mismo. Son pocos los reportes que se tienen del efecto agudo de los compuestos fenólicos sobre la presión arterial, ya que en su mayoría los estudios sobre su consumo se llevan a cabo a largo plazo. Algunos estudios realizados a largo plazo son el realizado por Paredes-Carrera y col (2015), quienes evaluaron el efecto de extractos fenólicos obtenidos a partir de cacao y frutos cítricos, durante 6 semanas a una concentración de 100 mg/kg. A su vez, Suzuki y col (2002) reportaron el efecto a largo plazo (6 semanas) de extractos fenólicos de granos de café en ratas espontáneamente hipertensas, así como el efecto de una dosis única, en la cual registraron los valores de presión arterial hasta 48 h después de haber administrado el extracto. Sin embargo, con el propósito de analizar la posibilidad de obtener una dosis de extracto fenólico que asemejara su efecto hipotensor al del control positivo (captopril), fue que se optó por la evaluación del efecto agudo del extracto hasta las 6 h de su administración, similar a lo reportado por Fritz y col. (2011) y Ramírez-Torres y col (2017), quienes realizaron estudios para evaluar el efecto agudo de hidrolizados proteínicos de semillas de amaranto sobre la presión arterial en REH.

En la presente investigación el valor promedio de presión arterial sistólica en REH antes de administrar las diferentes dosis de extractos fenólicos fue de 220 mmHg. Investigaciones acerca de los modelos animales para el estudio de la hipertensión arterial estiman un valor de presión promedio en ratas espontáneamente hipertensas de 200 a 210 mmHg en la adultez (Takahashi y col., 2004). El desarrollo de hipertensión arterial en este modelo animal comienza a partir de las 6 semanas de edad, sin ninguna intervención quirúrgica, fisiológica o farmacológica. Sin embargo, los factores ambientales pueden afectar el desarrollo de hipertensión, por lo que la importancia de

este modelo se ha atribuido a la similitud de su fisiopatología con el desarrollo de hipertensión en seres humanos (Dornas y Silva 2011). Por ello fue determinante establecer con pruebas preliminares en cual semana las ratas serían hipertensas y a partir de esto, cuándo se administraría el extracto. La medición de la PAS se tomó en ratas conscientes ya que la anestesia disminuye la PA (Biancardi y col 2007); esto para evitar alguna interacción de la anestesia con el extracto, evitando alteración en los resultados.

En la presente investigación el medicamento captopril fue empleado como un control positivo para el control de la presión arterial de las REH. El efecto del captopril sobre las ratas, ya ha sido reportado en otros estudios utilizando una dosis de 10 mg/kg debido a que es un potente inhibidor de la ECA (Koike y col 1980; Douglas y Eikenburg 1984; Chiu y col 1984).

a. Efecto de la administración de extractos fenólicos de harinas de frijol común sobre la PAS en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a la administración

En los **Cuadros 11, 12, 13 y 14** y las **Figuras 8, 9, 10 y 11** se presentan los valores PAS en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos (1.5, 3, 4.5 y 6 h) posteriores a la administración de diferentes dosis (50, 150, 250 y 500 mg/kg) de extractos fenólicos hidrofílicos libres y ligados de harinas de frijol común correspondientes a las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Para evaluar el efecto del tiempo de administración de los extractos fenólicos de cada una de las muestras estudiadas sobre la PAS en las REH se aplicó una prueba t Student para

muestras pareadas con una $p \leq 0.05$. En los Cuadros 12, 13 y 14 y Figuras 9, 10 y 11 se puede ver que en general la PAS disminuyó significativamente después de la administración de los extractos fenólicos a los diferentes tiempos estudiados (1.5, 3, 4.5 y 6 h) después de la administración del mismo, para la mayoría de las dosis estudiadas (150, 250 y 500 mg/kg).

En los extractos de fenólicos libres y ligados de harinas de frijol común crudo y bioprocesado por FES, en ambas variedades estudiadas (Azufrado Higuera y Negro Jamapa), (**Cuadro 11 y 12; Figuras 8 y 9**), se observaron pocos cambios significativos en la PAS de REH a las dosis de 50 y 150 mg/kg a los diferentes tiempos transcurridos después de la administración de los extractos. Solo es de destacar la disminución de PAS [entre -4.91% y -6.08% (Δ PAS entre -10.86 y -13.45 mmHg)] por la dosis de 150 mg/kg de extractos fenólicos ligados de las harinas de frijol bioprocesado de ambas variedades después de 4.5 y 6 h de la administración de dichos extractos.

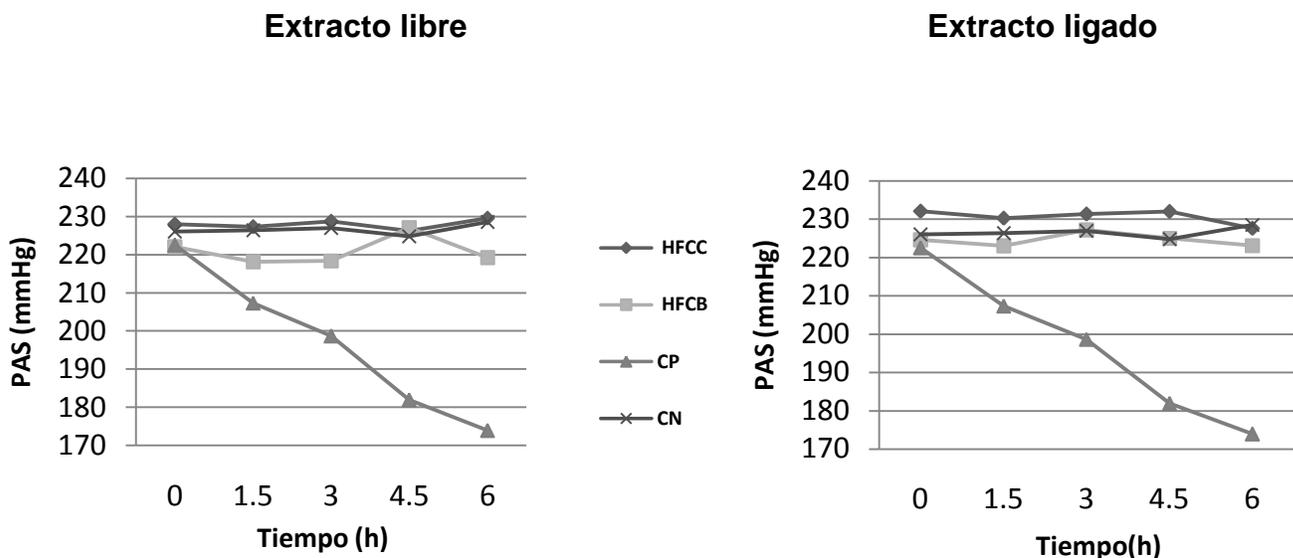
En la mayoría de los casos, la administración a REH de una dosis de 250 mg/kg de extractos de fenólicos libres y ligados de harinas de frijol común crudo y bioprocesado por FES, de ambas variedades estudiadas, se observó una disminución significativa de PAS después de transcurrir los diferentes tiempos estudiados (1.5, 3, 4.5 y 6 h) a partir de la administración de los mismos, excepto la administración del extracto de fenólicos de la fracción libre, la cual no causó una disminución significativa de PAS en ninguno de los tiempos estudiados (**Cuadro 13; Figura 10**). Las disminuciones más importantes de PAS (entre -5.16% y -13.21%) se presentaron a las 4.5 y 6 h posteriores a la administración de los extractos fenólicos con la dosis arriba mencionada.

Cuadro 11. Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de **50 mg/kg** sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.

Grupos	Tiempo posterior a la administración del extracto (h)				
	0	1.5	3	4.5	6
Azufrado Higuera					
Crudo					
Extracto fenólico libre	228 ^a	227.33 ^a	228.71 ^a	226.26 ^a	229.61 ^a
Extracto fenólico ligado	232.13 ^a	230.29 ^a	231.28 ^a	232.03 ^a	227.65 ^a
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	222.07 ^a	218.14 ^b	218.42 ^b	227.07 ^a	219.23 ^b
Extracto fenólico ligado	224.64 ^a	223.09 ^a	227.24 ^a	225.08 ^a	223.18 ^a
Negro Jamapa					
Crudo					
Extracto fenólico libre	225.75 ^a	226.74 ^a	224.06 ^a	227.40 ^a	220.95 ^b
Extracto fenólico ligado	219.95 ^b	217.31 ^b	223.92 ^b	226.16 ^a	228.14 ^a
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	231.79 ^a	231.37 ^a	227.24 ^a	232.12 ^a	231.21 ^a
Extracto fenólico ligado	231.18 ^a	228.96 ^a	226.43 ^a	231.70 ^a	234.34 ^a
Controles					
Captopril (10 mg/kg)	222.54 ^a	207.34 ^b	198.68 ^c	181.94 ^d	173.93 ^e
Agua desionizada (1 mL/kg)	226.04 ^a	226.41 ^a	226.96 ^a	224.79 ^a	228.58 ^a

^{a,b,c,d,e} Las medias de PAS en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (prueba t Student para medias pareadas, $p \leq 0.05$, $n=6$).

Variedad Azufrado Higuera



Variedad Negro Jamapa

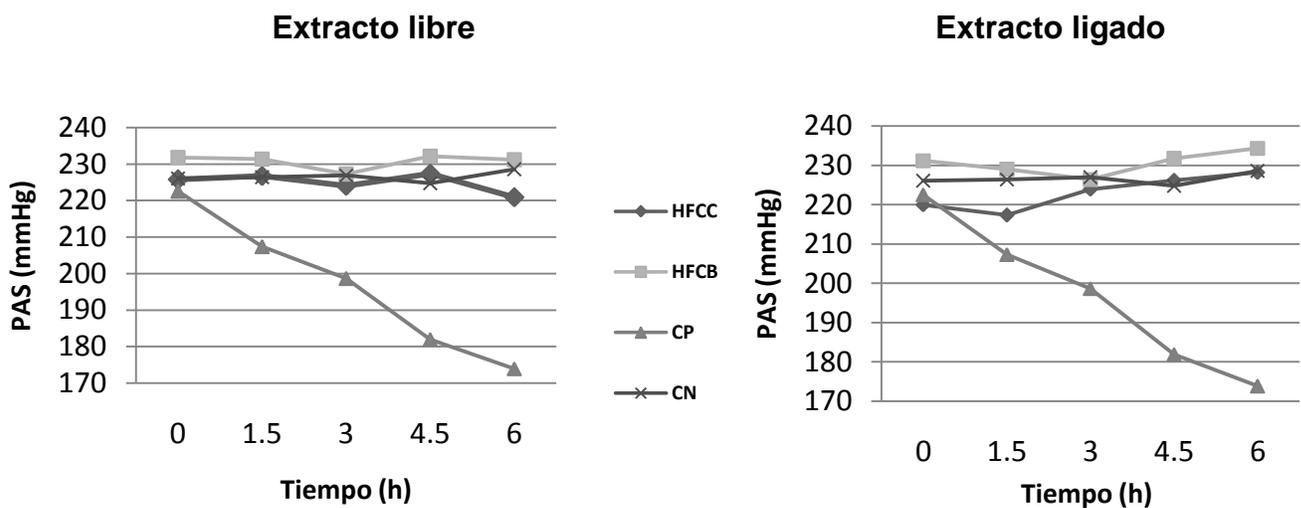


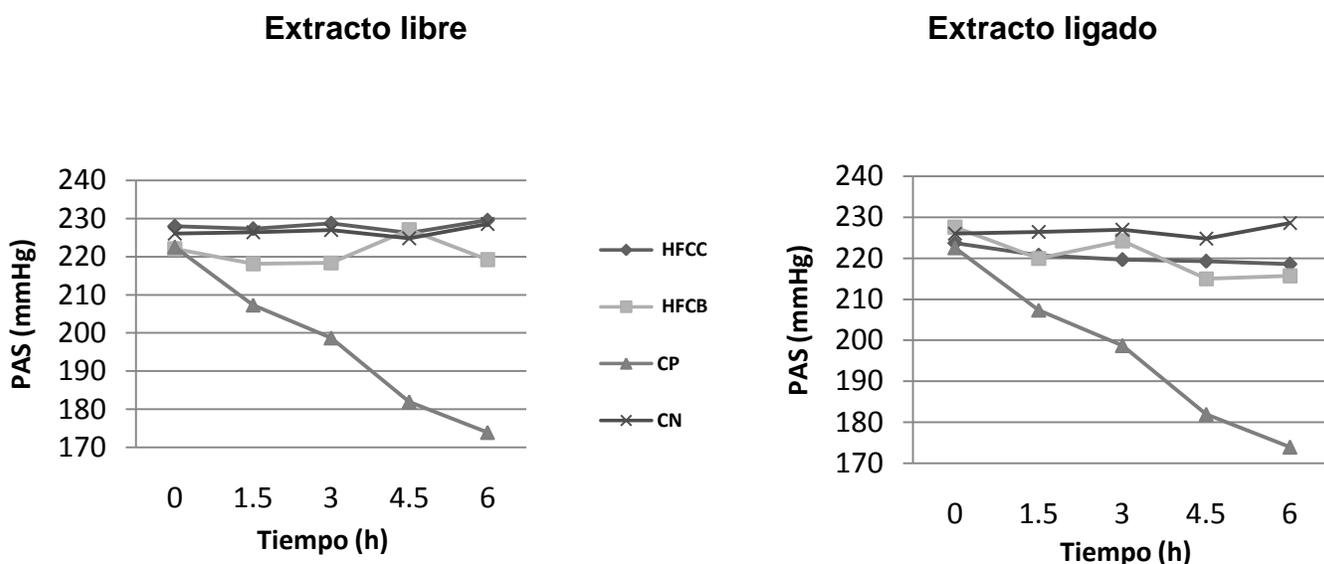
Figura 8. Efecto de la administración de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de **50 mg/kg**, sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas. **HFCC** = Harina de frijol común crudo, **HFCEB** = Harina de frijol común bioprocesado, **CP**= Control positivo, **CN**= Control negativo.

Cuadro 12. Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de **150 mg/kg** sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.

Grupos	Tiempo posterior a la administración del extracto (h)				
	0	1.5	3	4.5	6
Azufrado Higuera					
Crudo					
Extracto fenólico libre	224.59 ^a	227.84 ^a	222.72 ^b	230.62 ^a	230.82 ^a
Extracto fenólico ligado	223.68 ^a	220.77 ^a	219.63 ^a	219.25 ^a	218.58 ^a
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	226.11 ^a	215.17 ^b	215.58 ^b	222.51 ^a	223.20 ^a
Extracto fenólico ligado	227.55 ^a	220 ^b	224.24 ^a	215.02 ^b	215.69 ^b
Negro Jamapa					
Crudo					
Extracto fenólico libre	224.93 ^a	226.03 ^a	217.77 ^b	215.84 ^b	218.41 ^b
Extracto fenólico ligado	225.31 ^a	221.16 ^a	217.89 ^b	222.69 ^a	223.89 ^a
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	229.95 ^a	222.68 ^b	221.99 ^b	218.60 ^b	216.97 ^b
Extracto fenólico ligado	221.36 ^a	221.54 ^a	215.77 ^b	210.49 ^c	207.90 ^c
Controles					
Captopril (10 mg/kg)	222.54 ^a	207.34 ^b	198.68 ^c	181.94 ^d	173.93 ^e
Agua desionizada (1 mL/kg)	226.04 ^a	226.41 ^a	226.96 ^a	224.79 ^a	228.58 ^a

^{a,b,c,d,e} Las medias de PAS en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (prueba t Student para medias pareadas, $p \leq 0.05$, $n=6$).

Variedad Azufrado Higuera



Variedad Negro Jamapa

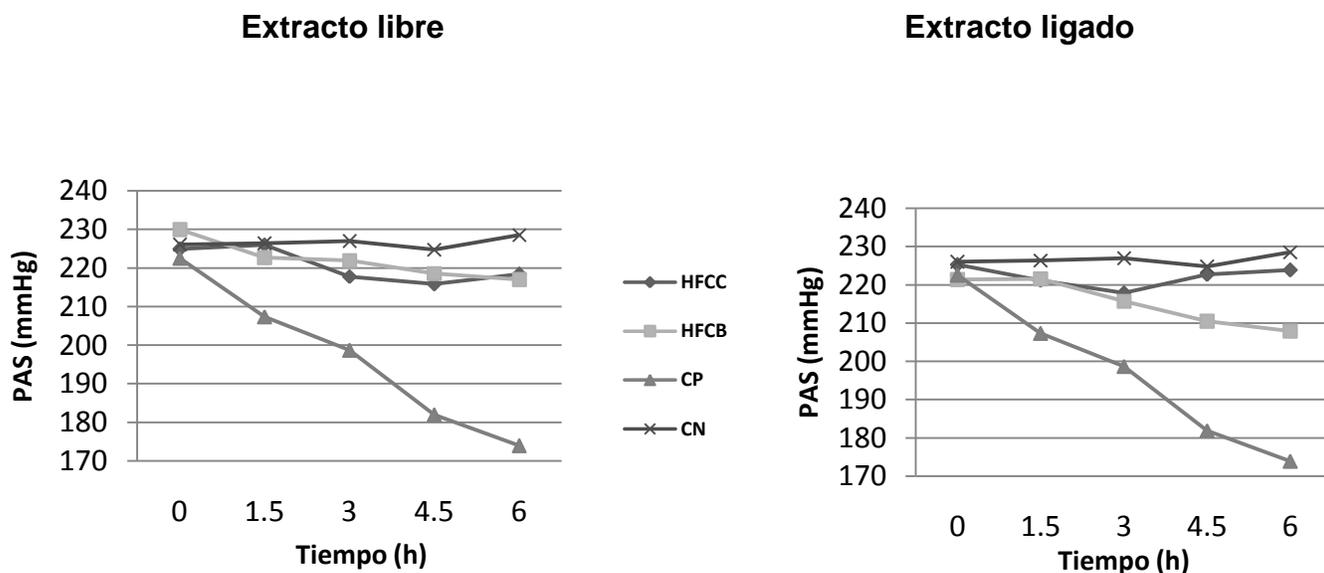


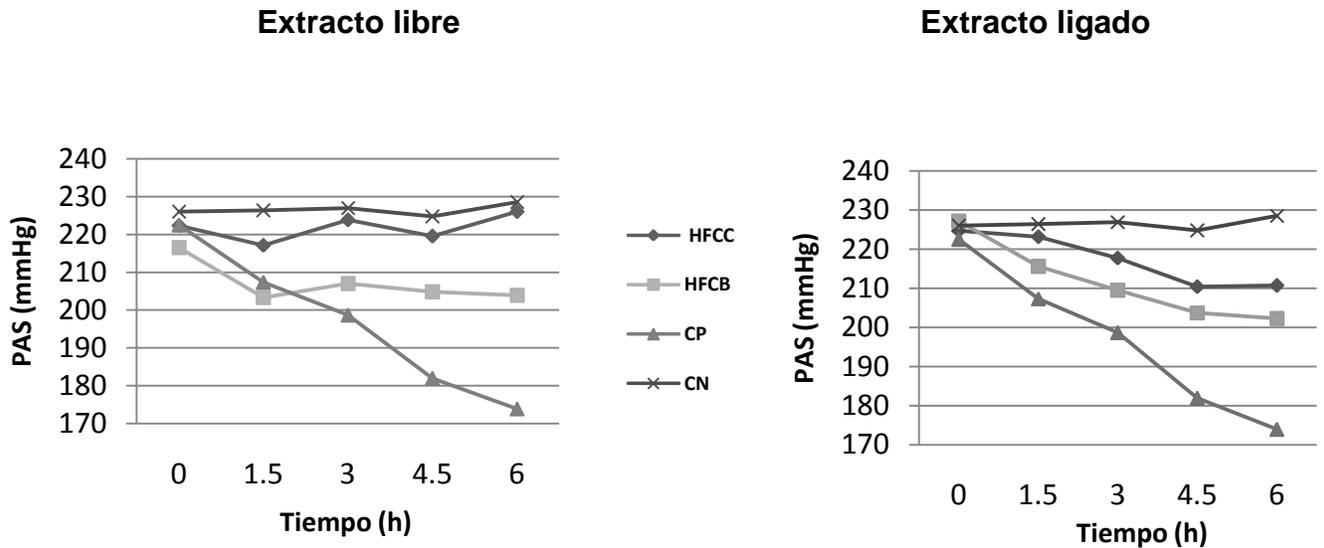
Figura 9. Efecto de la administración de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de **150 mg/kg**, sobre la presión arterial sistólica [PAS (mmHg)] en ratas espontáneamente hipertensas. **HFCC** = Harina de frijol común crudo, **HFCEB** = Harina de frijol común bioprocesado, **CP**= Control positivo, **CN**= Control negativo

Cuadro 13. Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de **250 mg/kg** sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.

Grupos	Tiempo posterior a la administración del extracto (h)				
	0	1.5	3	4.5	6
Azufrado Higuera					
Crudo					
Extracto fenólico libre	222.37 ^a	217.16 ^a	223.88 ^a	219.56 ^a	226.05 ^a
Extracto fenólico ligado	224.76 ^a	223.22 ^a	217.76 ^b	210.71 ^c	210.43 ^c
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	216.52 ^a	203.32 ^b	207.05 ^b	204.82 ^b	203.93 ^b
Extracto fenólico ligado	227.17 ^a	215.59 ^b	209.52 ^c	203.76 ^d	202.26 ^d
Negro Jamapa					
Crudo					
Extracto fenólico libre	227.74 ^a	225.51 ^a	220.68 ^b	212.45 ^c	211.76 ^c
Extracto fenólico ligado	225.53 ^a	217.35 ^b	210.40 ^c	206.14 ^d	207.05 ^d
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	226.22 ^a	216.81 ^b	214.34 ^b	208.25 ^b	196.34 ^c
Extracto fenólico ligado	221.24 ^a	217.91 ^a	210.87 ^b	204.05 ^c	201.85 ^c
Controles					
Captopril (10 mg/kg)	222.54 ^a	207.34 ^b	198.68 ^c	181.94 ^d	173.93 ^e
Agua desionizada (1 mL/kg)	226.04 ^a	226.41 ^a	226.96 ^a	224.79 ^a	228.58 ^a

^{a,b,c,d,e} Las medias de PAS en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (prueba t Student para medias pareadas, $p \leq 0.05$, $n=6$).

Variedad Azufrado Higuera



Variedad Negro Jamapa

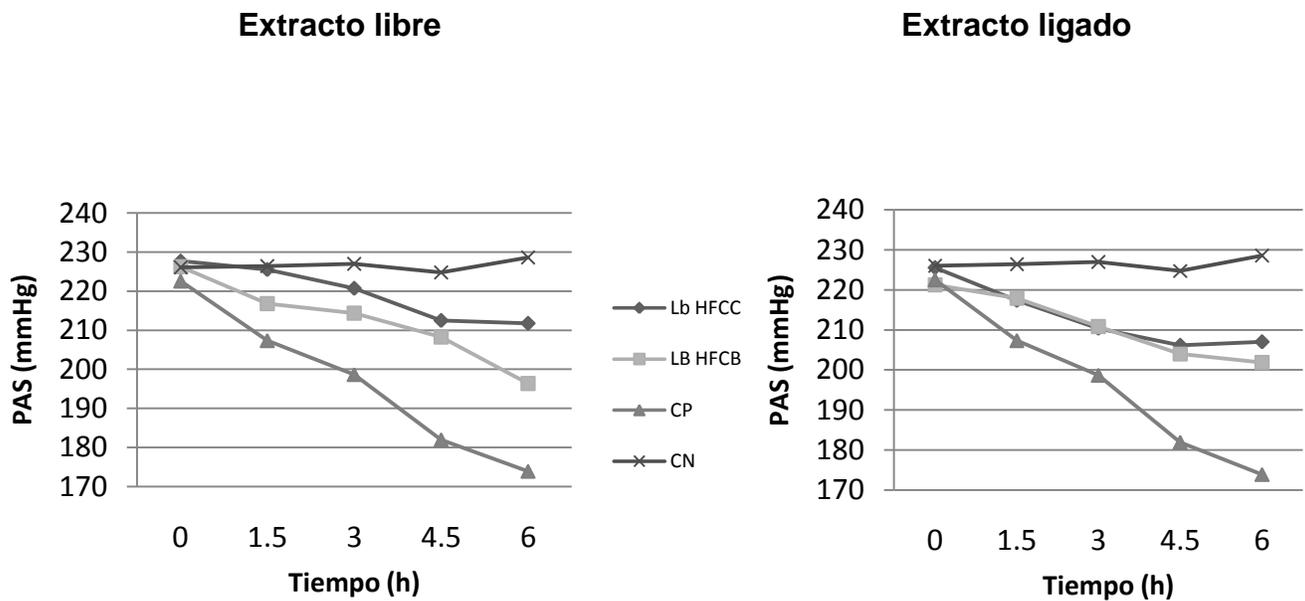


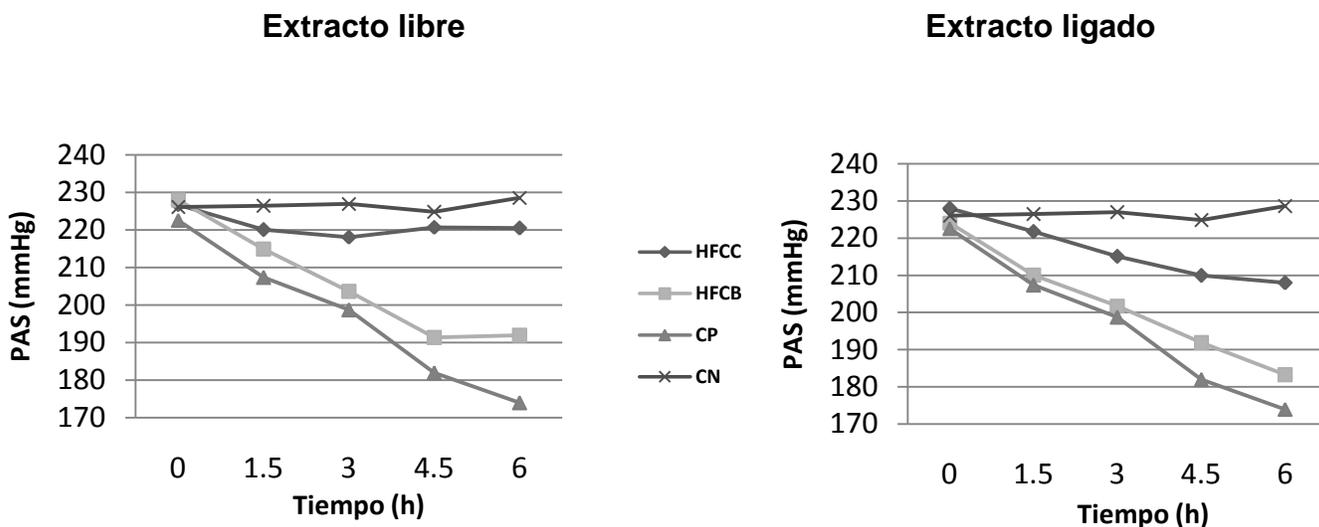
Figura 10. Efecto de la administración de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de **250 mg/kg**, sobre la presión arterial sistólica [PAS (mmHg)] en ratas espontáneamente hipertensas. **HFCC** = Harina de frijol común crudo, **HFCB** = Harina de frijol común bioprocesado, **CP**= Control positivo, **CN**= Control negativo

Cuadro 14. Efecto de extractos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado, a una dosis de **500 mg/kg** sobre la presión arterial sistólica (mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas a diferentes tiempos posteriores a su administración.

Grupos	Tiempo posterior a la administración del extracto (h)				
	0	1.5	3	4.5	6
Azufrado Higuera					
Crudo					
Extracto fenólico libre	226.69 ^a	220.06 ^b	218.05 ^b	220.70 ^b	220.46 ^b
Extracto fenólico ligado	227.99 ^a	221.72 ^b	215.05 ^c	209.93 ^d	207.92 ^d
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	227.95 ^a	214.89 ^b	203.59 ^c	191.31 ^d	191.92 ^d
Extracto fenólico ligado	224.07 ^a	209.99 ^b	201.73 ^c	191.86 ^d	183.23 ^e
Negro Jamapa					
Crudo					
Extracto fenólico libre	227.58 ^a	221.47 ^b	215.92 ^c	204.27 ^d	192.53 ^e
Extracto fenólico ligado	224.91 ^a	215.82 ^b	207.54 ^c	201.70 ^d	197.29 ^e
Bioprocesado					
Extracto fenólico libre	220.71 ^a	208.88 ^b	202.33 ^c	188.11 ^d	173.45 ^e
Extracto fenólico ligado	219.75 ^a	211.89 ^b	202.84 ^c	189.20 ^d	183.28 ^e
Controles					
Captopril (10 mg/kg)	222.54 ^a	207.34 ^b	198.68 ^c	181.94 ^d	173.93 ^e
Agua desionizada (1 mL/kg)	226.04 ^a	226.41 ^a	226.96 ^a	224.79 ^a	228.58 ^a

^{a,b,c,d,e} Las medias de PAS en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (prueba t Student para medias pareadas, $p \leq 0.05$, $n=6$).

Variedad Azufrado Higuera



Variedad Negro Jamapa

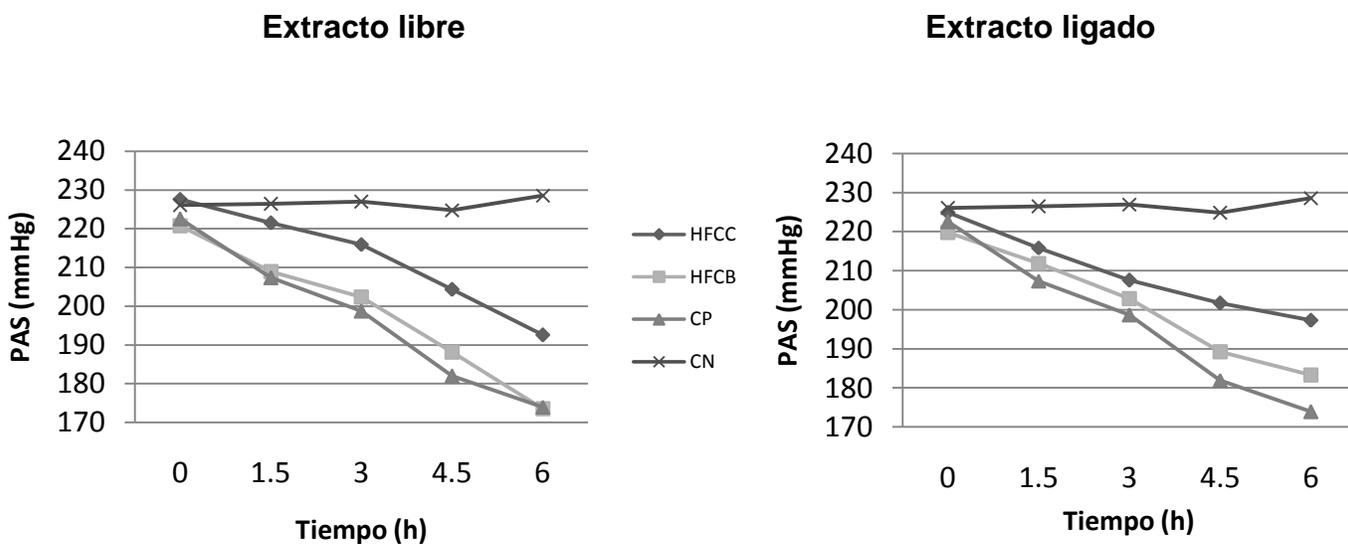


Figura 11. Efecto de la administración de extractos fenólicos libres y ligados de frijol común crudo y bioprocesado a una dosis de **500 mg/kg**, sobre la presión arterial sistólica [PAS (mmHg)] en ratas espontáneamente hipertensas. **HFCC** = Harina de frijol común crudo, **HFCEB** = Harina de frijol común bioprocesado, **CP**= Control positivo, **CN**= Control negativo

Todos los extractos estudiados, administrados a las REH con una dosis de 500 mg/mL, causaron una disminución significativa de PAS después de 1.5, 3, 4.5 y 6 h transcurridas a partir de la administración de los mismos (**Cuadro 14; Figura 11**). Esta dosis de extractos causó las mayores disminuciones de PAS en todos los tratamientos. Las disminuciones más grandes de PAS (entre -8.80% y -21.41%) con la dosis de 500 mg/mL de extractos se presentaron a las 6 h posteriores a la administración de los mismos, excepto en el extracto de fenólicos libres de la harina de frijol crudo de la variedad Azufrado Higuera, la cual solo causó una disminución ligera (-2.75%) de PAS a partir de las 1.5 h transcurridas a partir de la administración de este extracto, y permaneció sin cambios hasta las 6 h que duró el experimento. Además, en el caso del extracto de fenólicos ligados de la harina de frijol crudo y el extracto de fenólicos libres de la harina de frijol bioprocesado de la variedad Azufrado Higuera no se presentaron diferencias significativas entre los valores de PAS a las 4.5 y 6 h posteriores a la administración de estos extractos. En las ratas tratadas con el control negativo (solución tween + agua) no se presentaron disminuciones significativas de la PAS, mientras que la administración a REH de 10 mg/kg del medicamento captopril, empleado como control positivo, causó una disminución significativa de la PAS a los diferentes tiempos estudiados; el mayor efecto (disminución de PAS= -21.84%) de este medicamento se presentó a las 6 h después de haberlo administrado. El extracto de fenólicos libres obtenido a partir de la harina de frijol común bioprocesado de la variedad Negro Jamapa causó una disminución de la PAS (-21.41%) similar a la de captopril, después de 6 horas de haber sido suministrado a REH. Los resultados de esta investigación demuestran que extractos fenólicos de harinas de frijol común de las variedades

Azufrado Higuera y Negro Jamapa tienen un potencial antihipertensivo similar al captopril, uno de los medicamentos más comúnmente empleado para el control de la presión arterial en sangre de humanos.

b. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y dosis administrada sobre la disminución de PAS en REH suplementadas con extractos fenólicos de harinas de frijol común

Para analizar el efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y dosis administrada sobre la disminución de la presión arterial sistólica [Δ PAS (mmHg)] en ratas espontáneamente hipertensas (REH) suplementadas con extractos fenólicos de harinas de frijol común se seleccionó un tiempo de 6 h posteriores a la administración mismos, ya que en los resultados del punto anterior se encontró que a este tiempo de estudio se tuvieron los mejores resultados de efecto antihipertensivo de los extractos estudiados.

En el **Cuadro 15** se muestran los valores de Δ PAS a las 6 h de la administración de diferentes dosis (50, 150, 250, 500 mg/kg) de extractos fenólicos hidrofílicos, libres y ligados, de harinas de frijol común correspondientes a las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Los extractos fenólicos mostraron valores de Δ PAS desde insignificantes hasta valores similares (Δ PAS= -36.03 a -47.26 mmHg) al captopril (-48.61 mmHg), el medicamento comúnmente empleado para el control de la presión arterial en humanos.

Cuadro 15. Valores de Δ PAS a las 6 h de la administración de diferentes dosis (50, 150, 250, 500 mg/kg) de extractos fenólicos libres y ligados, de harinas de frijol común crudo y bioprocesado.

Grupos	Dosis (mg/kg)			
	50	150	250	500
Azufrado Higuera				
Frijol crudo				
Fracción libre	1.6131372	6.2311588	3.6834558	-6.2318697
Fracción ligada	-4.4752806	-5.101389	-14.047143	-20.0700599
Frijol bioprocesado				
Fracción libre	-2.8339286	-2.90928072	-12.5885007	-36.0324858
Fracción ligada	-1.4622436	-11.8602823	-24.905556	-40.8450544
Negro Jamapa				
Frijol crudo				
Fracción libre	-4.8062083	-6.5157903	-15.986858	-35.044988
Fracción ligada	8.192067	-1.4285616	-18.484396	-27.625341
Frijol bioprocesado				
Fracción libre	-0.5874603	-12.9828358	-29.8810152	-47.2554762
Fracción ligada	3.1599531	-13.458687	-19.39254	-36.4678891

Los resultados son expresados como disminución de la presión arterial sistólica (Δ PAS mmHg)

El valor de **Δ PAS** más pequeño (-47.26 mmHg) se presentó en el extracto de fenólicos libres de la harina de frijol variedad Negro Jamapa a una concentración de 500 mg/kg.

En el punto anterior se reportó que la evaluación del efecto agudo de los extractos fenólicos hasta las 6 h de su administración se realizó con el propósito de obtener una dosis de extracto fenólico que asemejara su efecto hipotensor al del control positivo (captopril). Es en este sentido que la dosis de 500 mg/kg del extracto fenólico con mayor actividad antihipertensiva *in vivo*, mencionado anteriormente, sería el extracto que asemejaría su efecto hipotensor al del captopril.

En el **Cuadro 16** se muestra el análisis de varianza de los datos de **Δ PAS**. Se puede observar que los efectos principales de las variables independientes **proceso**, **variedad de frijol** y **dosis**, así como, la interacciones **proceso * variedad de frijol**, **proceso * dosis**, **variedad de frijol * extracto**, **variedad de frijol * dosis** fueron significativos ($p < 0.05$) para la respuesta **Δ PAS**. El efecto principal **extracto**, así como, el resto de interacciones fueron no significativas ($p > 0.05$) para esta respuesta. Cuando los términos no significativos ($p > 0.05$), mencionados anteriormente, fueron eliminados en el análisis de varianza, los resultados mostraron que no hubo mejoras en cuanto a la aparición de nuevos efectos significativos para esta variable de respuesta estudiada (**Cuadro 17**). En la **Figura 13** se observa que tres de los términos significativos fueron los que explicaron el mayor porcentaje de la variación de la respuesta **Δ PAS**; el término **dosis** explicó el 53%, y el término **proceso** explicó el 8.40%, mientras que el término de interacción **variedad de frijol * extracto** explicó el 5.73% de la variación total de la variable **Δ PAS**. En la presente investigación el término error explicó un porcentaje (18.49%) alto de la variación total de la variable **Δ PAS**. Esto puede

Cuadro 16. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y dosis administrada sobre la disminución de PAS (Δ PAS mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	33507.83	31	1080.90	18.20	<0.0001**
A:PROCESO	3452.27	1	3452.27	58.12	<0.0001**
B:VARIEDAD	1133.36	1	1133.36	19.08	<0.0001**
C:EXTRACTO	94.48	1	94.48	1.59	0.2095
D: DOSIS	21975.57	3	7325.19	123.33	<0.0001**
Interacciones					
AB	268.16	1	268.16	4.51	0.0355*
AC	117.17	1	117.17	1.97	0.1626
AD	1457.95	3	485.98	8.18	<0.0001**
BC	2356.88	1	2356.88	39.68	<0.0001**
BD	1132.68	3	377.56	6.36	0.0005**
CD	454.23	3	151.41	2.55	0.0587
ABC	70.14	1	70.14	1.18	0.2792
ABD	435.05	3	145.02	2.44	0.0673
ACD	224.40	3	74.80	1.26	0.2912
BCD	145.21	3	48.40	0.81	0.4878
ABCD	190.28	3	63.43	1.07	0.3652
RESIDUOS	7602.46	128	59.39		
TOTAL (CORREGIDO)	41110.29	159			

* Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

Cuadro 17. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol y dosis administrada sobre la disminución de PAS (Δ PAS mmHg) en ratas espontáneamente hipertensas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	32231.09	31	2014.44	32.44	<0.0001**
A:PROCESO	3452.27	1	3452.27	55.60	<0.0001**
B:VARIEDAD	1133.36	1	1133.36	18.25	<0.0001**
D: DOSIS	21975.57	3	7325.19	117.97	<0.0001**
Interacciones					
AB	268.16	1	268.16	4.32	0.0395*
AD	1457.95	3	485.98	7.83	<0.0001**
BC	2356.88	1	2356.88	37.96	<0.0001**
BD	1132.68	3	377.56	6.08	0.0006**
CD	454.23	3	151.41	2.44	0.0670
RESIDUOS	8879.20	128	62.09		
Falta de ajuste	1276.73	15	85.12	1.43	0.1415
Error puro	7602.46	128	59.39		
TOTAL (CORREGIDO)	41110.29	159			

* Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

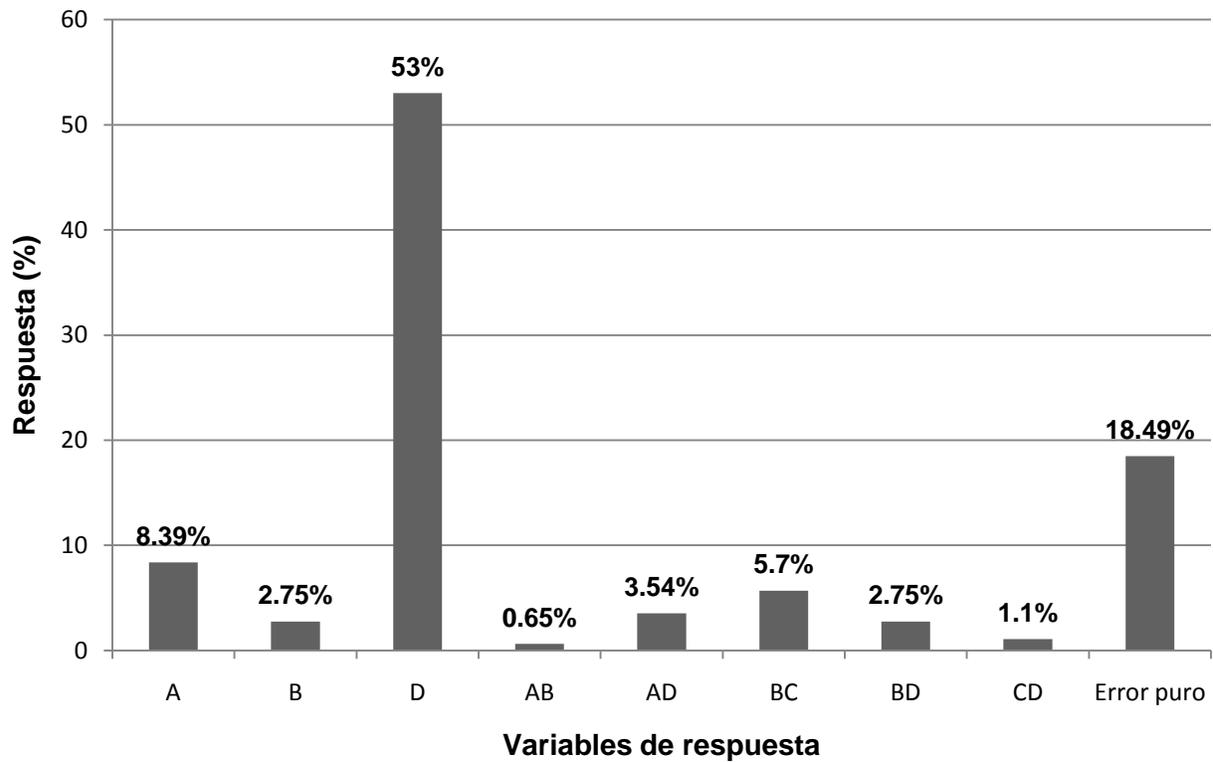


Figura 12. Efecto de las variables de proceso, variedad de frijol y dosis, así como las interacciones proceso * variedad de frijol, proceso * dosis, variedad * tipo de extracto, variedad * dosis, tipo de extracto * dosis y error puro sobre la disminución de la presión arterial sistólica (Δ PA_S) en ratas espontáneamente hipertensas.

explicarse por el empleo de un modelo animal para realizar el presente estudio. Es una característica distintiva de los modelos animales los valores altos de error experimental obtenidos en las variables de respuesta estudiadas. En esta sección solo se presentará el efecto de interacción gráfico, ya que las cuatro variables independientes estudiadas están involucradas en alguna interacción significativa. En la **Figura 14** se reporta el efecto de interacción gráfico sobre la respuesta **ΔPAS** . En la figura se aprecia que de manera general los valores de **ΔPAS** disminuyeron de una forma dosis-dependiente (a mayor dosis de extracto menor valor de **ΔPAS**), sin embargo, el comportamiento no fue generalizado, ya que existieron algunos tratamientos en los cuales los valores de **ΔPAS** no cambiaron con la dosis de extracto suministrada a las **REH**, como es el caso del extracto de fenólicos libres del frijol Higuera Azufrado (**Figura 14**). En esta figura también se aprecia que en general los extractos de frijol común bioprocesado por FES presentaron un mayor efecto sobre los valores de **ΔPAS** que los extractos de las harinas de frijol sin procesar. En la **Figura 14** también se puede apreciar que de manera general los extractos fenólicos de las harinas de frijol variedad Negro Jamapa presentaron un mayor efecto sobre la variable **ΔPAS** que los extractos fenólicos de las harinas del frijol variedad Azufrado Higuera, excepto los extractos de fenólicos ligados de las harinas de frijol bioprocesado por **FES** de ambas variedades, las cuales presentaron un efecto similar sobre la **ΔPAS** .

El estudio de alimentos funcionales con propiedades nutraceuticas en modelos clínicos reportan la presencia de compuestos químicos responsables de estas propiedades, como la capacidad antihipertensiva mediante la inhibición de la ECA. Uno de los compuestos que han sido mayormente estudiados son los péptidos con actividad

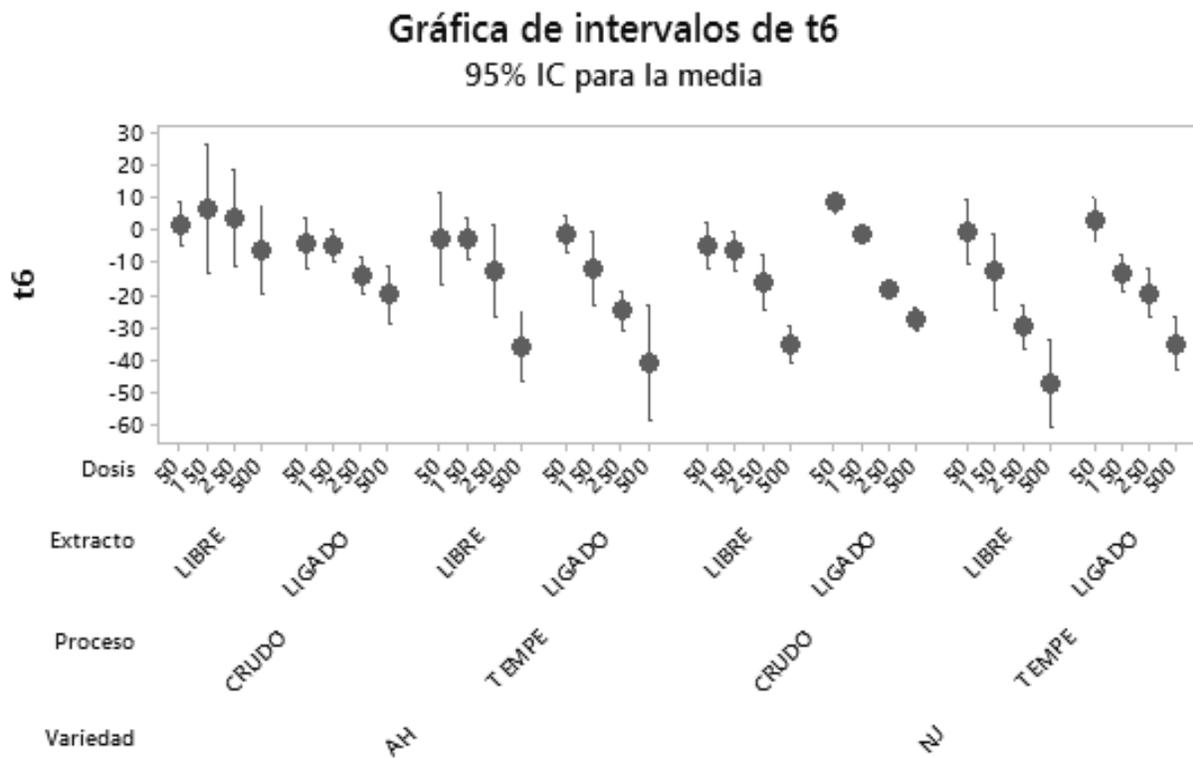


Figura 13. Efecto de interacción gráfico sobre la disminución de la presión arterial sistólica (ΔPAS) en ratas espontáneamente hipertensas.

biológica. Guan-Hong y col en el 2006 administraron hidrolizados proteicos de frijol mungo en ratas espontáneamente hipertensas a una concentración de 400 mg/kg, obteniendo su máxima reducción a las 6 h de su administración (-30.8 mmHg), considerablemente menor al mejor tratamiento obtenido en el presente trabajo de investigación con una reducción de-47.21 mmHg a las 6 h de la administración del extracto. Actualmente se ha reportado la presencia de capacidad antihipertensiva en compuestos fenólicos y sus derivados como saponinas esteroidales, terpenos, glucósidos, entre otros, que se encuentran de forma abundante en diversas especies vegetales, especialmente en granos como las leguminosas. González-Ramos y col (2011) realizaron un ensayo *in vivo* en ratas hipertensas, en el cual administraron un extracto fenólico a partir de semillas de chía. La concentración que obtuvo mejores resultados fue la de 400 mg/kg, la cual reportó una disminución de presión arterial sistólica de tan solo 16.75% a las 3 semanas después de su administración, en relación con su control positivo (Captopril) con una reducción del 28.06%. Asimismo, se ha evaluado la actividad antihipertensiva de los diversos compuestos fenólicos por separado. Por ejemplo la eficacia de la suplementación de ácido ferúlico. Suzuki y col (2002), administraron ácido ferúlico puro a una concentración de 50 mg/kg en **REH**, obteniendo una reducción de la PAS del 11% a las 6 h, así como también, en el 2006 administraron ácido clorogénico (300 mg/kg), obteniendo un 14% de disminución a las 9 h (Suzuki y col 2006). Por otro lado, Quiñones y col (2013), administraron una mezcla purificada de proantocianidinas (250 mg/kg) en donde se destacó la presencia de quercetina y kaempferol, y reportaron una disminución de la PAS de -31.77 mmHg a tan solo 2 h de haber administrado el tratamiento.

Se ha reportado en diversos estudios la presencia de ácidos fenólicos en el frijol común como el ácido ferúlico y clorogénico, además de flavonoides como el kaempferol, por lo que se puede relacionar el efecto antihipertensivo de los extractos fenólicos libres y ligados de esta leguminosa fermentada a la presencia de estos compuestos. De igual manera, se puede relacionar a la FES como la responsable del incremento de estos compuestos y el consecuente aumento del potencial antihipertensivo, ya que el frijol crudo no demostró una disminución considerable de la PAS en comparación con el frijol bioprocesado. Lo anterior explica, que existen compuestos con una naturaleza química similar a los que pueden encontrarse en el extracto fenólico de frijol común, con efecto de inhibición de la ECA e hipotensor, en algunos de ellos se ha demostrado el efecto de manera individual y en otros el efecto que en conjunto generan estos compuestos.

Es evidente destacar que el extracto de frijol común bioprocesado tiene una acción benéfica sobre la presión arterial y que uno de los mecanismos por los que se genera pudiera ser por una inhibición de la ECA, efecto que se comprobó *in vitro* en esta investigación. Sin embargo, es importante continuar su estudio para identificar el compuesto específico que presente el mayor efecto hipotensor, sus sinergias y/o antagonismos y la seguridad en su administración crónica, ya que puede presumirse al frijol común como un alimento funcional prometedor en la terapéutica alternativa de la hipertensión arterial.

B. Potencial antimutagénico *in vitro* de harina de frijol común (variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa) crudo y bioprocesado

La evaluación de la capacidad antimutagénica de los extractos fenólicos de frijol común se realizó empleando el Ensayo de Ames. Se utilizaron los métodos de incorporación en placa e incubación con la cepa YG1024 de *S. typhimurium* y el mutágeno empleado fue 1-nitropireno. En el **cuadro 18**, se presentan los resultados obtenidos del número de revertantes/placa inducidas por el mutágeno 1-nitropireno en presencia de los extractos fenólicos de frijol común; también se presentan los valores de índice de mutagenicidad (IM) que presentó cada tratamiento. El índice de mutagenicidad (IM) se calculó como la razón entre el número de revertantes inducidas por los extractos fenólicos de cada una de las muestras evaluadas y el número de revertantes espontáneas. La muestra evaluada es considerada mutagénica si $IM \geq 2$ y citotóxica si $IM \leq 0.6$ (Ames y col., 1973). En todos los tratamientos se obtuvo un IM de ~ 1 , por lo tanto, ninguno de los diferentes extractos fenólicos evaluados resultó tóxico ni mutagénico para la bacteria a la dosis de 250 $\mu\text{g/mL}$, y fue posible evaluar su antimutagenicidad.

En el **Cuadro 19** se muestran los valores de potencial antimutagénico, expresado como porcentaje de inhibición (**PI**) de la mutagenicidad, de extractos fenólicos hidrofílicos de harinas de frijol común correspondientes a las variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Los extractos fenólicos mostraron los siguientes valores de **PI**: Para la variedad Azufrado Higuera, 50.6% y 43.2% para los extractos libres y ligados de frijol crudo, respectivamente y 67.8% y 64% en extractos libres y ligados de frijol bioprocesado, respectivamente; para la variedad Negro Jamapa, 47.2% en la fracción

Cuadro 18. Índice de mutagenicidad y número de revertantes/plato de extractos fenólicos de frijol común.

Grupos	IM	Num. Revertantes/plato
Azufrado Higuera		
Crudo		
Extracto fenólico libre	0.913	55 ±3.203
Extracto fenólico ligado	1.043	63 ±1.347
Bioprocesado		
Extracto fenólico libre	0.978	36 ±2.905
Extracto fenólico ligado	0.847	40 ±2.219
Negro Jamapa		
Crudo		
Extracto fenólico libre	1.021	59 ±2.009
Extracto fenólico ligado	1.152	57 ±2.036
Bioprocesado		
Extracto fenólico libre	1.130	36 ±1.387
Extracto fenólico ligado	1.065	34 ±2.341

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar

Cuadro 19. Porcentaje de inhibición de mutagenicidad de extractos fenólicos de frijol común

Grupos	Crudo	Bioprocesado
Azufrado Higuera		
Extracto fenólico libre	50.6 ^a	67.8 ^b
Extracto fenólico ligado	43.2 ^a	64.0 ^b
Negro Jamapa		
Extracto fenólico libre	47.2 ^a	67.9 ^b
Extracto fenólico ligado	49.2 ^a	69.2 ^b

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de mutagenicidad (%). ^{a,b} Los valores de % de inhibición en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$).

libre y 49.2% en la fracción ligada para el frijol crudo, y 67.9% en la fracción libre y 69.2% en la fracción ligada del frijol bioprocesado. La antimutagenicidad se clasifica de acuerdo a la escala propuesta por Wall y col (1988) de **PI**: 0–20% negativa, 20–40% débil, 40–60% positiva, 60–90% fuerte, >90% sospecha de toxicidad De acuerdo a esta escala se puede decir que, los extractos fenólicos, tanto en su forma libre como ligada, de ambas variedades de frijol sin procesar (crudo) presentaron valores de **PI** correspondientes a una antimutagenicidad positiva, mientras que, los extractos fenólicos libres y ligados del frijol bioprocesado por FES, en ambas variedades, presentaron una antimutagenicidad fuerte.

En el **Cuadro 20** se muestra el análisis de varianza de los datos de **PI**. Se puede observar que los efectos principales de las variables independientes **proceso**, **variedad de frijol** y **extracto**, así como, la interacción **variedad de frijol * extracto** fueron significativos ($p < 0.05$) para la respuesta **PI**. En la **Figura 15** se observa que estos tres términos explicaron el 96.82% de la variación total de la variable **PI**. También, se puede ver que el efecto principal de la variable **proceso** fue la que presentó la mayor contribución (92.09%) a la variación total de la respuesta **PI**. En la **Figura 16** se reporta el efecto principal gráfico de la variable **proceso**. En la figura se aprecia que los valores más altos del porcentaje de inhibición correspondieron a las harinas de frijol bioprocesado por FES independientemente de la variedad de frijol y el tipo de extracto empleados. Esto significa que, el bioproceso de FES mejoró sustancialmente el potencial antimutagénico (de positivo a fuerte) de los extractos fenólicos hidrofílicos del frijol común, en la variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa. En la **Figura 17** se muestra el efecto de interacción **variedad de frijol * extracto**. En la figura se observa

Cuadro 20. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y sus interacciones sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2445.79	7	349.40	82.18	<0.0001**
A:PROCESO	2315.05	1	2315.05	544.50	<0.0001**
B:VARIEDAD	22.45	1	22.45	5.28	0.0354*
C:EXTRACTO	26.04	1	26.04	6.13	0.0249*
AB	3.32	1	3.32	0.78	0.3898
AC	2.13	1	2.13	0.50	0.4897
BC	70.29	1	70.29	16.53	0.0009**
ABC	6.51	1	6.51	1.53	0.2338
ERROR PURO	68.03	1	4.25		
TOTAL (CORREGIDO)	2513.82	23			

* Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

Cuadro 21. Efecto de las variables proceso, variedad de frijol, tipo de extracto y la interacción de las variables variedad * tipo de extracto sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2433.83	4	608.46	144.54	<0.0001**
A:PROCESO	2315.05	1	2315.05	549.93	<0.0001**
B:VARIEDAD	22.45	1	22.45	5.33	0.0354*
C:EXTRACTO	26.04	1	26.04	6.19	0.0249*
BC	70.29	1	70.29	16.70	0.0009**
RESIDUOS	79.99	19	4.21		
Falta de ajuste	11.96	3	3.99	0.94	0.4456
Error puro	68.03	16	4.25		
TOTAL (CORREGIDO)	2513.82	23			

* Nivel de significancia a $P < 0.05$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

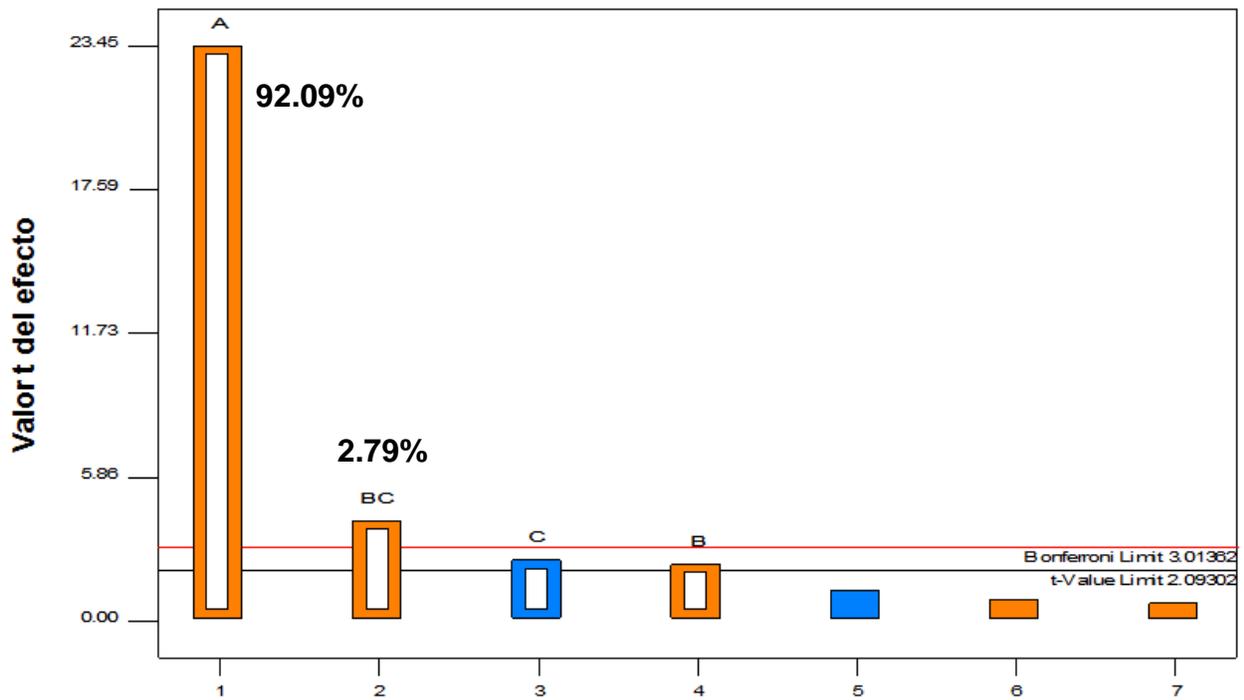


Figura 14. Diagrama de Pareto de los efectos principales e interacciones. A: *Proceso*, B: *Variedad de frijol*, C: *Tipo de extracto* BC: Interacción *variedad de frijol * tipo de extracto* sobre el porcentaje de inhibición de mutagenicidad.

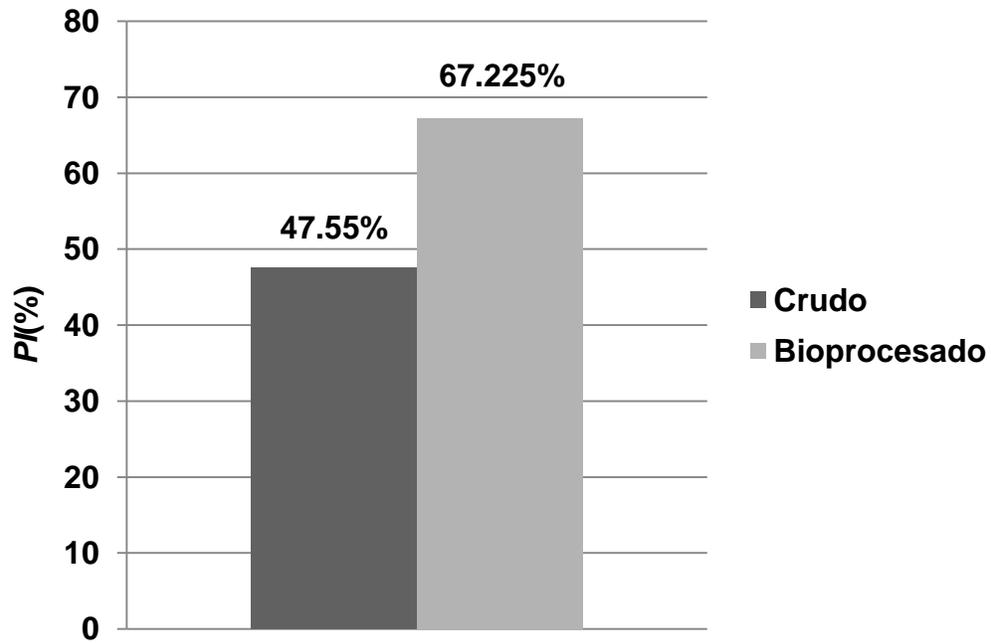


Figura 15. Efecto principal de la variable **proceso** sobre el porcentaje de inhibición mutagénica. **PI:** Porcentaje de inhibición (%).

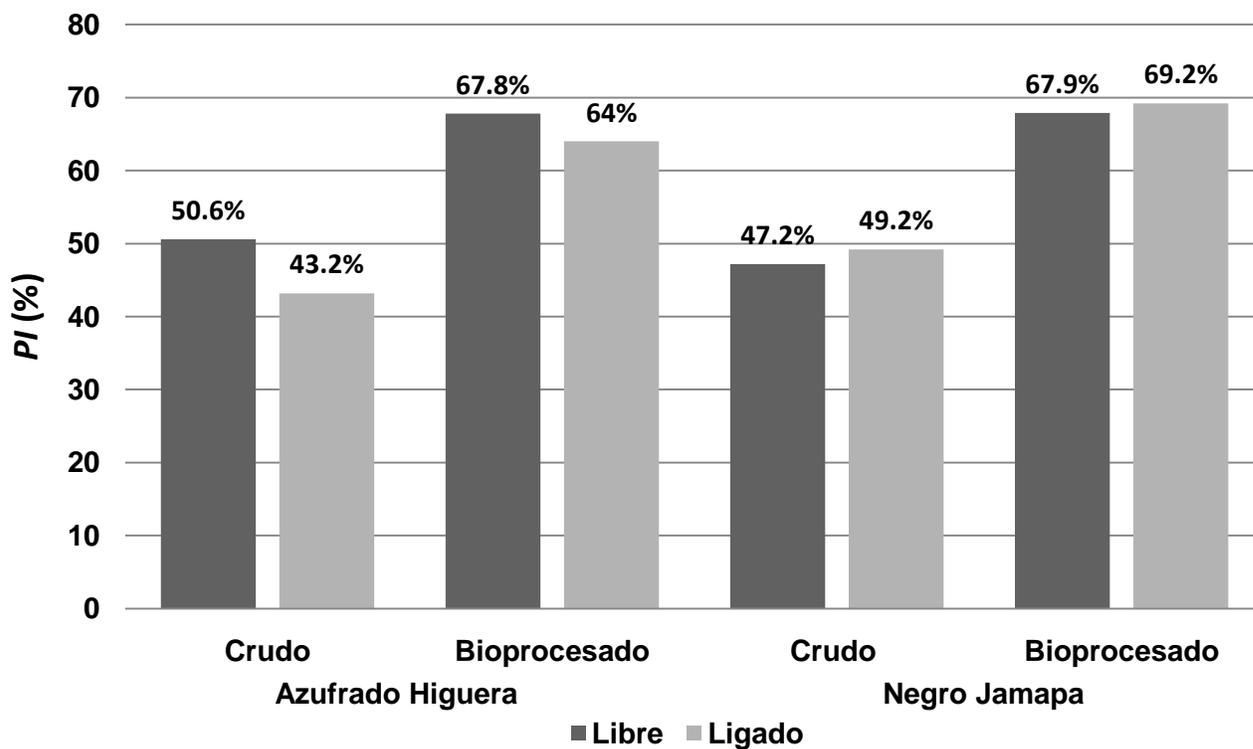


Figura 16. Efecto de la interacción de las variables *variedad de frijol*tipo de extracto* sobre el porcentaje de inhibición mutagénica. *PI*: Porcentaje de inhibición (%).

que para la variedad de frijol Azufrado Higuera el extracto libre presentó el mayor porcentaje de inhibición, mientras que, para la variedad de frijol Negro Jamapa el extracto ligado presentó la mayor inhibición, tanto en las muestras de frijol crudo como bioprocesado

Los valores de inhibición de mutagenicidad de los extractos de compuestos fenólicos libres del frijol común *Phaseolus vulgaris* L. encontrados en la presente investigación son similares a lo reportado por Cardador-Martínez y col. (2006) con un 47% de inhibición en extractos metanólicos, así como, Rocha-Guzmán y col (2007), quienes obtuvieron un valor de inhibición superior al 50% en extractos acetónicos en 4 variedades de frijol común; mientras que, de Mejía y col (1999) estudiaron el **PI** de diferentes extractos de compuestos fenólicos de frijol común en su fracción libre, encontrando actividad antimutagénica solo en los extractos metanólicos, los cuales, a una dosis de 250 µg/plato tuvieron un **PI** de 30% contra el mutágeno 1-nitropireno, y el cual resultó ser más bajo que los valores encontrados en la presente investigación (43.2–50.6%). En el presente estudio se obtuvieron dos fracciones de compuestos fenólicos que fueron extraídas con diferentes metodologías, la fracción libre (extracción con etanol al 80%) y la fracción ligada (extracción con acetato de etilo a partir del residuo obtenido de la extracción de compuestos fenólicos libres), sin embargo, no se encontraron resultados en la literatura acerca de la actividad antimutagénica de extractos fenólicos ligados de frijol común.

El aumento de la actividad antimutagénica tras la fermentación en estado sólido también fue reportado por Hung y col. (2007), en soya negra. En este estudio, ellos llevaron a cabo la FES empleando diversos hongos filamentosos GRAS (generalmente reconocido como seguro), incluyendo *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus azygosporus* y *Rhizopus sp.* El potencial antimutagénico se evaluó a extractos metanólicos de soya negra sin fermentar y soya negra fermentada. La prueba de antimutagenicidad se realizó frente al 4-nitroquinolina-N-óxido (4-NQO), un mutágeno directo, y Benzo [a] pireno (B [a] P), un mutágeno indirecto, en *Salmonella Typhimurium* TA100 y TA 98. En general, los extractos de soya negra fermentada con *A. awamori* exhibieron el mayor efecto antimutagénico. Con la cepa TA100, el **PI** de 5 mg/placa de extracto de soya negra fermentada por *A. awamori* frente a los efectos mutagénicos de 4-NQO y B [a] P fueron 92% y 89%, respectivamente, mientras que los **PI** correspondientes a los extractos de soya no fermentada fueron 41% y 63%, respectivamente. Con la cepa TA98, los **PI** fueron 94 y 81% para el extracto de soya fermentada, y 58% y 44% para los extractos de soya sin fermentar. En este trabajo, ellos también demostraron que el tiempo y la temperatura de fermentación influyeron significativamente en la actividad antimutagénica. El estudio realizado en los extractos preparados a partir de soya negra fermentada por *A. awamori* a temperaturas de 25, 30 y 35°C y durante 1-5 días reveló que, generalmente, el extracto preparado a partir de granos fermentados a 30°C durante 3 días exhibió el mayor **PI** contra los efectos mutagénicos de 4-NQO y B [a] P. En el presente trabajo de investigación las temperaturas y tiempos de fermentación empleados para bioprocesar frijol común con *Rhizopus oligosporus* fueron 33.5 - 38°C, y 100 - 108 h (4.2-4.5 días), respectivamente.

Cabe mencionar que, las condiciones de FES empleadas para bioprocesar frijol común, en sus variedades Azufrado Higuera y Negro Jamapa, fueron optimizadas previamente por Sánchez-Magaña y col. (2014) y Rochín-Medina y col (2016), respectivamente. Sin embargo, las variables de respuesta empleadas fueron el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante, las cuales se buscó maximizar sus valores. Con base a lo encontrado por Hung y col. (2007) se puede decir que en un futuro es necesario llevar a cabo la optimización del bioprocesamiento por FES de frijol común para encontrar los mejores valores de temperatura y tiempo de fermentación que den por resultado la máxima actividad antimutagénica *in vitro* posible, así como, emplear diferentes cepas de hongos GRAS para llevar a cabo la FES. Estos resultados futuros podrían mostrar que la FES llevada a cabo con un microorganismo iniciador apropiado y bajo condiciones de cultivo apropiadas podría mejorar relativamente el potencial antimutagénico del frijol común. Es de resaltar que en la presente investigación la concentración de extracto empleada fue significativamente menor (0.25 mg/plato) que las utilizadas en el trabajo desarrollado por Hung y col. (2007) (0.625vs 5 mg/plato). Con la concentración de extracto más baja (0.625 mg/plato) que ellos emplearon, encontraron que los valores de **PI** más altos fueron 62% y 64% para soya fermentada con las cepas *A. sojae* y *A. awamori*, respectivamente, los cuales fueron similares a los valores de **PI** (64.0 – 69.2%) encontrados en esta investigación para extractos de frijol común bioprocesado por FES, pero empleando una concentración de extracto más baja. Lee y col (2007), encontraron que los mayores valores de actividad antimutagénica en soya negra fermentada se relacionaron a contenidos altos de compuestos fenólicos, antocianinas y agliconas. Entre los compuestos más estudiados

con la finalidad de buscar agentes quimiopreventivos están los polifenoles, que agrupan a los flavonoides (tales como los flavonoles, las flavononas, las isoflavonas), las antocianinas, los taninos y los lignanos, muchos de los cuales se encuentran presentes en frutas, vegetales, bebidas como el té y el vino y en una gran variedad de granos y leguminosas (Ferguson, 2001).

Ciertos polifenoles pueden influir directamente modulando la expresión génica de enzimas que participan en la reparación libre de error del ADN. La actividad antioxidante en estos compuestos se ha asociado a su habilidad para eliminar los radicales libres y de inhibir los citocromos P450 o enzimas con actividad oxidante como las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas (Abalea y col., 1999). De esta manera, puede relacionarse el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos con la capacidad antimutagénica en *Salmonella typhimurium*.

Existe una estrecha correlación entre la mutagénesis y la carcinogénesis; varios investigadores han atribuido las tasas relativamente bajas de cáncer de mama, próstata y colon en los países asiáticos al consumo de granos como la soya, los cuales contienen factores antimutagénicos. Evitar la exposición a mutágenos y comer una cantidad adecuada de alimentos nutritivos que contengan antimutágenos puede reducir la tasa de mutación y la incidencia de cáncer en humanos;”la dieta es la mayor fuente de exposición humana a los carcinógenos y mutágenos ambientales, sin embargo, también lo es para los antimutágenos y anticarcinogénicos”. Es por ello que, es importante destacar la relevancia de los resultados obtenidos en la presente investigación y continuar las investigaciones, con la finalidad de promover al tempe de

frijol común como una alternativa de alimento funcional con diversas propiedades nutraceuticas que ayudan a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer.

X. CONCLUSIONES

1. La **FES**, en condiciones optimizadas, incrementó la capacidad antihipertensiva *in vitro* de extractos fenólicos del frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa, disminuyendo el valor **IC₅₀** de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA de 0.56-0.89 mg/mL en harinas de frijol común crudo (HFCC) a 0.18-0.49 mg/mL en harinas de frijol común bioprocesado (HFCEB) por FES).
2. El extracto de fenólicos libres presentó el menor valor de **IC₅₀** en la variedad Azufrado Higuera, mientras que el extracto de fenólicos ligados fue el que presentó el valor de **IC₅₀** más pequeño en la variedad Negro Jamapa.
3. Los datos de porcentaje de inhibición de ECA se ajustaron adecuadamente a un comportamiento sigmoideal, lo cual significa que el efecto de los extractos fenólicos sobre esta respuesta presentó un comportamiento dosis dependiente (a mayor concentración de extracto mayor valor de inhibición de ECA).
4. El bioproceso de **FES**, en condiciones optimizadas, mejoró la capacidad antihipertensiva *in vivo* de extractos fenólicos de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa, disminuyendo significativamente la presión arterial sistólica (**PAS**) en ratas espontáneamente hipertensas hasta las 6 h de estudio para la mayoría de las dosis estudiadas (150, 250 y 500 mg/kg). La concentración de 500 mg/kg de extractos fenólicos libres y ligados causó las mayores disminuciones de **PAS** (Δ **PAS**= -36.03 a -47.26mmHg) a los diferentes tiempos estudiados, y no presentó diferencias significativas con el captopril (Δ **PAS**= -48.61 mmHg) a las 6 h de estudio.

5. Los valores de **Δ PAS** disminuyeron de una forma dosis-dependiente del extracto (a mayor dosis de extracto menor valor de **Δ PAS**) en la mayoría de las muestras analizadas, excepto el extracto de fenólicos libres del frijol Higuera Azufrado.
6. Los extractos fenólicos de las harinas de frijol variedad Negro Jamapa presentaron un mayor efecto sobre la variable **Δ PAS** que los extractos fenólicos de las harinas del frijol variedad Azufrado Higuera en la mayoría de las muestras estudiadas, excepto los extractos de fenólicos ligados de las harinas de frijol bioprocesado por **FES** de ambas variedades, las cuales presentaron un efecto similar sobre **Δ PAS**.
7. La **FES**, en condiciones optimizadas, mejoró el potencial antimutagénico de extractos fenólicos de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa, aumentando el porcentaje de inhibición de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* contra el mutágeno 1-nitropireno de 43.2-50.6% (antimutagenicidad positiva) en HFCC a 64.0-69.2% (antimutagenicidad fuerte) en HFCEB, a una concentración de 250 μ g/mL.
8. El extracto de fenólicos libres presentó el mayor valor de porcentaje de inhibición de mutagenicidad en la variedad Azufrado Higuera, mientras que el extracto de fenólicos ligados fue el que presentó el valor de porcentaje de inhibición de mutagenicidad más alto en la variedad Negro Jamapa.
9. La FES, en condiciones optimizadas, es una estrategia efectiva para mejorar el potencial antihipertensivo y antimutagénico de frijol común Azufrado Higuera y Negro Jamapa. Así como, las HFCEB representan una potencial alternativa natural para el control de la presión arterial elevada y la prevención de cáncer en personas que sufren o son propensas a estos padecimientos.

XI.BIBLIOGRAFÍA

- Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, More II. 1999. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radical Biology and Medicine*; 26:1457-1466.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS letters* 555(3):597-600.
- Ademiluyi AO, Oboh G. 2013. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65(3):305-309.
- Adom, KK., & Liu, RH. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6182-6187.
- Akindumila, F., & Glatz, BA. (1998). Growth and oil production of *Apitrichum curvatum* in tomato juice. *Journal of food protection*, 61(11), 1515-1517.
- Aldaco-Sarvide, F, Pérez-Pérez, P, Cervantes-Sánchez, G, & Torrecillas-Torres, L. 2012. Erazo-VA. Mortalidad por cáncer en México, 2000-2010: el recuento de los daños. *Gamo*, 11, 371-379.
- Al Shukor N, Van Camp J, Gonzales GB, Staljanssens D, Struijs K, Zotti MJ, Raes K, Smagghe G. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(48):11832-11839.

- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, & Lee FD. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2281-2285.
- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Lopez-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C. (2008). Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food chemistry*, 106(1), 106-112.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis 16^o ed. Harla, *Association of Official Analytical Chemists*. St. Paul, EUA.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis 16th edn. *Association of Official Analytical Chemist*. Washington, CD, EUA.
- Arroyo P. 2008. La alimentación en la evolución del hombre: su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(6), 431-440.
- Atchibri A, Kouakou T, Brou K, Kouadio Y, Gnakri D. 2010. Evaluation of bioactive components in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) cultivated in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 31:1928-1934.
- Basu A, & Lucas EA. (2007). Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, 65(8), 361-375.
- Diebolt, M., Bucher, B., & Andriantsitohaina, R. (2001). Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38(2), 159-165.

- Barampama Z y Simard RE. 1993. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chemistry*, 47(2), 159-167.
- Berlett BS y Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272(33):20313-20316.
- Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, y Campos RR. (2007). Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(3), 401-408.
- Birujete-Guzmán A, Juárez-Hernández E, Sieiro-Ortega E, Romero-Viruegas R, Silencio-Barrita J. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana* 76(3).
- Blair MW, Pantoja W, Hidalgo R. 2007. Diversidad de faseolinas en frijol común cultivado del Caribe. *ACTA AGRON (PALMIRA)* 56(4):171-176.
- Breimer LH. 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Molecular carcinogenesis* 3(4):188-197.
- Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Rojas-Martínez R, Pedroza A, Medina-García C, Barquera-Cervera S. 2013. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud pública de México* 55:S144-S150.
- 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.
- 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.
- Cardador-Martinez A, Albores A, Bah M, Calderon-Salinas V, Castano-Tostado E, Guevara-Gonzalez R, Shimada-Miyasaka A, Loarca-Pina 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.
- Céspedes-Miranda E, Rodríguez-Capote K, Llopiz-Janer N, Cruz-Martí N. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 19(3):186-190.
- Creus E. 2004. Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito farmacéutico* 23:80-84.
- Crisan D, Carr J. 2000. Angiotensin I-converting enzyme. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2(3):105-115.
- Chau CF, Cheung PC, Wong YS. 1997. Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2500-2503.
- Chen XL, He HL, Wu H, Sun CY, Zhang YZ, y Zhou BC. 2007. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with

angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology*, 98(18), 3499-3505.

Cheng KC, Wu JY, Lin JT, Liu WH. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* spp. *European Food Research and Technology* 236(6):1107-1113.

Chiu PJS, Brown AD y Barnett A. (1984). Inhibitory effect of captopril on renal responses to furosemide in sodium-restricted rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 36(1), 31-35.

Danilczyk U, Eriksson U, Oudit G, Penninger J. 2004. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cellular and molecular life sciences* 61:2714-2719.

De León L, Bressani R, Elías L. 1990. Efecto de la cáscara sobre el mecanismo de endurecimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris*): resultados preliminares. *Agronomía Mesoamericana* 1:87-91.1990.

De Mejia EG, Castano-Tostado E, Loarca-Piña G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 441(1):1-9.

Dinesh P, Bhakayaraj R y Vidhyalaksmi R. 2009. A Review: A low cost nutritious food “Tempeh”. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 4(1): 22-27

Deshpande S, Cheryan M. 1986. Microstructure and water uptake of *Phaseolus* and winged beans. *Journal of Food Science* 51(5):1218-1223.

- 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-Arce D. 2004. Óxido nítrico, mutagénesis y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 23(3):184-189.
- Doria E, Campion B, Sparvoli F, Tava A, Nielsen E. 2012. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* 26(1):72-80.
- Dornas WC y Silva ME. (2011). Animal models for the study of arterial hypertension. *Journal of biosciences*, 36(4), 731-737.
- Du SK, Jiang H, Ai Y, Jane JI. 2014. Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. *Carbohydrate polymers* 108:200-205.
- Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Angeles Ocete M, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. 2001. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology* 133(1):117-124.
- Edenharder R, Tang X. 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology* 35(3):357-372.
- Eikenburg DC. (1984). Effects of captopril on vascular noradrenergic transmission in SHR. *Hypertension*, 6(5), 660-665.

- Elsadr HT, Marles M, Caldas GV, Blair MW, Bett KE. 2015. Condensed Tannin Accumulation during Seed Coat Development in Five Common Bean Genotypes. *Crop Science* 55(6):2826-2832.
- Fabbri AD, Crosby GA. 2015. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*.
- Farjas-Abadía P. 2003. Sobre los alimentos funcionales. *Revista Española de Salud Pública* 77(3):313-316.
- Ferguson LR. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*; 475: 89-111.
- Frassinetti S, Gabriele M, Caltavuturo L, Longo V, 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.
- Frias J, Song YS, Martínez-Villaluenga C, De Mejia EGI, Vidal-Valverde C. 2007. Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(1):99-105.
- Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G y Añón MC. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878-884.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* 37(2):123-131.

- González-Camaño A, Pérez-Balmes J y Nieto-Sánchez CM. 2014. Importancia de las enfermedades crónico degenerativas dentro del panorama epidemiológico actual de México. *Salud pública de México*, 28(1), 3-13.
- González-Ramos V. 2011. Efecto hipotensor e inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I de extractos de semillas de salvia hispánica L. in vitro e in vivo [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León. 185 p.
- Guajardo-Flores D, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA. 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 141(2):1497-1503.
- Guzmán-Uriarte ML, Sánchez-Magaña LM, Angulo-Meza GY, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Mora-Rochín Sy 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.
- Halliwel B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews* 70(5):257-265.
- 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.

- Hernández-Saavedra D,McCord JM. 2007. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 45(5).
- Hung YH, Huang HY y Chou CC. 2007. Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. *International journal of food microbiology*, 118(1), 62-68.
- Ikasari L,Mitchell D. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(3):320-324.
- Jennessen J, Schnürer J, Olsson J, Samson RA,Dijksterhuis J. 2008. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycological research* 112(5):547-563.
- Jones PA. 2003. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences* 983(1):213-219.
- Kao C,Robinson R. 1978. Nutritional aspects of fermented foods from chickpea, horsebean, and soybean [Proteins, rats]. *Cereal Chemistry*.
- Kaushik JK y Bhat R. 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26458-26465.
- Koike H, Ito K, Miyamoto M y Nishino H. 1980. Effects of long-term blockade of angiotensin converting enzyme with captopril (SQ14, 225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR. *Hypertension*, 2(3), 299-303.

- Konar N, Poyrazoğlu ES, Demir K, Artik N. 2012. Determination of conjugated and free isoflavones in some legumes by LC–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 25(2):173-178.
- Königsberg R, Rögelsperger O, Jäger W, Thalhammer T, Klimpfinger M, Santis MD, Hudec M, Dittrich C. 2008. Cell cycle dysregulation influences survival in high risk breast cancer patients. *Cancer investigation* 26(7):734-740.
- Kozuma K, Tsuchiya S, Kohori J, Hase T, Tokimitsu I. 2005. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertension research* 28(9):711-718.
- Laurena AC, Garcia VV y Mendoza EMT. 1986. Effects of soaking in aqueous acidic and alkali solutions on removal of polyphenols and in vitro digestibility of cowpea. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 36(2), 107-118.
- Lee IH, Hung YH y Chou CC. 2007. Total phenolic and anthocyanin contents, as well as antioxidant activity, of black bean koji fermented by *Aspergillus awamori* under different culture conditions. *Food chemistry*, 104(3), 936-942.
- Lee IH, Hung YH, Chou CC. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International journal of food microbiology* 121(2):150-156.
- Lee SH, Qian ZJ y Kim SK. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.
- 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.

- Lin MJY, Humbert ES y Sosulski FW. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368-370.
- Lo Turco V, Potortì AG, Rando R, Ravenda P, Dugo G, Di Bella G. 2016. Functional properties and fatty acids profile of different beans varieties. *Natural product research*:1-6.
- López MCR. 2005. Extracción, Separación e Identificación de Algunos Fitoesteroles, Saponinas y Flavonoides Presentes en el Frijol Negro (*Phase vulgaris*)-*Edición Única*.
- Maldonado SHG, Gallegos JAA, Álvarez-Muñoz M, García-Delgado S, Piña GL. 2015. Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 28(2):159-173.
- Maritim A, Sanders A, Watkins RJ. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 17(1):24-38.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6), 271-278.
- McCue P, Kwon YI y Shetty K. 2005. Anti-diabetic and anti-hypertensive potential of sprouted and solid-state bioprocessed soybean. *Asia pacific Journal of clinical nutrition*, 14(2).
- Mederos Y. 2013. Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 27(3):55-62.
- Messina V. 2014. Nutritional and health benefits of dried beans. *The American journal of clinical nutrition* 100(Supplement 1):437S-442S.

- Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review* 8:183-225.
- Molina M, Bressani R. 1975. Interrelationships between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science* 40(3):587-591.
- Montes ES, Pérez-Herrera P, Salinas-Moreno Y, Rojas-Herrera L. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia* 39(4):385-394.
- Mujica MV, Granito M, Soto N. 2012. Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. *Bioagro* 24(3):163-174.
- Münzel T, Keaney JF. 2001. Are ACE inhibitors a “magic bullet” against oxidative stress?. *Circulation* 104(13):1571-1574.
- Murphy SE, Heiblum R, King PG, Bowman D, Davis WJ, Stoner GD, Panigrahi G, Walker IG, McLellan E, Bird R. 1991. Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective. *Carcinogenesis* 12(6):949-956.
- Myatt L. 2010. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31:S66-S69.
- Nakitto AM, Muyonga JH, Nakimbugwe D. 2015. Effects of combined traditional processing methods on the nutritional quality of beans. *Food science & nutrition* 3(3):233-241.
- Nout M, Kiers J. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology* 98(4):789-805.

- Oboh G, Akindahunsi AA y Oshodi AA. (2002). Nutrient and anti-nutrient contents of Aspergillus niger-fermented cassava products (flour and gari). *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 617-622.
- Olagnero G, Abad A, Bendersky S, Genevois C, Granzella L, Montonati M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta* 25(121):20-33.
- Oomah BD, Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(6):935-942.
- Pak KJ, Hu T, Fee C, Wang R, Smith M, Bazzano LA. 2014. Acute hypertension: a systematic review and appraisal of guidelines. *The Ochsner Journal* 14(4):655-663.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process biochemistry* 35(10):1153-1169.
- Paredes-Lopez O, Reyes-Moreno C, Montes-Rivera R, Carabez-Trejo A. 1989. Hard-to-cook phenomenon in common beans-influence of growing location and hardening procedures. *International Journal of Food Science & Technology* 24(5):535-542.
- Park KY, Jung KO, Kwon EY. 2003. Development of a functional Chungkookjang (soybean paste fermented for 2-4 days) with anti-AGS human gastric cancer cell properties. *Preventive Nutrition and Food Science* 8(1):54-60.
- Pastrana L. 1996. Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *CYTA-Journal of Food* 1(3):4-12.

- Pepine CJ, Handberg EM, Cooper-DeHoff RM, Marks RG, Kowey P, Messerli FH, Mancía G, Cangiano JL, García-Barreto D, Keltai M. 2003. A calcium antagonist vs a non-calcium antagonist hypertension treatment strategy for patients with coronary artery disease: the International Verapamil-Trandolapril Study (INVEST): a randomized controlled trial. *Jama* 290(21):2805-2816.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1):76-89.
- Quiñones M, Guerrero L, Suarez M, Pons Z, Aleixandre A, Arola L y Mugerza B. 2013. Low-molecular procyanidin rich grape seed extract exerts antihypertensive effect in males spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 51(2), 587-595.
- Ramírez JCR, Rangel I. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente* 3(8).
- Ramírez-Torres G, Ontiveros N, Lopez-Teros V, Ibarra-Diarte J A, Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez EO, y Cabrera-Chávez F. (2017). Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 22(11), 1905.
- Randhir R, Shetty K. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(2):197-204.

- Ray H, Bett K, Tar'an B, Vandenberg A, Thavarajah D, Warkentin T. 2014. Mineral micronutrient content of cultivars of field pea, chickpea, common bean, and lentil grown in Saskatchewan, Canada. *Crop Science* 54(4):1698-1708.
- 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.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1603-1616.
- 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, Milán-Carrillo J, Valdez-Ortiz A, Delgado-Vargas F, Martín L, Sánchez-Magaña LM, Gutiérrez-Dorado R. 2014. Bebida con potencial nutracéutico elaborada con maíz QPM extrudido y frijol fermentado. *Revista Iberoamericana de Ciencias*.
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milan-Carrillo J, Gomez-Garza R. 2000a. Composición química y calidad nutritiva de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) fresco y endurecido después de la fermentación en estado sólido (FES). *Food Science and Technology International* 6(3):251-258.
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milán-Carrillo J, Valdéz-Torres B y Zárata-Márquez E. 2000b. Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh

from hardened chickpeas (*Cicer arietum* L). *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(3):219-228.

Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez E, Milán-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela O, Barrón-Hoyos J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(3):271-278.

Reynoso Camacho R, Ríos Ugalde MC, Torres Pacheco I, Acosta Gallegos JA, Palomino Salinas AC, Ramos Gómez M, González Jasso E, Guzmán Maldonado SH. 2007. El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura técnica en México* 33(1):43-52.

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.

Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JA. 2013. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. salud pública de México* 55:S332-S340.

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

- Sánchez-Magaña LM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Valdez-Ortiz A, Milán-Carrillo J y 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.
- Sandoval-Gallegos E. 2007. Determinación de la Digestibilidad del Almidón y proteína, Almidón Resistente de Proteína en frijol variedad "Pinto de Saltillo. Sandoval Gallegos EM, Ramírez Moreno E.: Palma Orozco G.; Suárez Dieguez T.; Área Académica de Nutrición. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Abasolo 600. CP 42000. Col. Centro. Pachuca Hidalgo. Tel. 017717975609 correo electrónico.
- Serrano M, López ML, Espuñes T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(4):58-68.
- Setchell KD, Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The journal of nutrition* 129(3):758S-767S.
- Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Rivera-Dommarco J y Hernández-Ávila M. 2016. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016). *Informe final de resultados*. Recuperado de <https://www.insp.mx/ensanut/medio-camino-16.html>.
- SIAP. 2014. SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA PESQUERA.

- Simic MG. 1988. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 202(2):377-386.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44(1):13-18.
- Sparringa RA y Owens JD. (1999). Protein utilization during soybean tempe fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4375-4378.
- Srivastava R y Vasishtha H. 2013. Dietary fiber, protein and lectin contents of lentils (*Lens culinaris*) with soaking and cooking. *Current Advances in Agricultural Sciences (An International Journal)* 5(2):238-241.
- Steinkraus K. 1995. Handbook of Indigenous Fermented Foods, revised and expanded. *CRC Press*.
- Steinkraus KH. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *Journal of Food Science*, 40, 168-170.
- Steinkraus KH. 2002. Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1(1):23-32.
- Suzuki A, Kagawa D, OchiaiR, Tokimitsu I y Saito I. 2002a. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25(1), 99-107.
- Suzuki A, Kagawa D, Fujii A, OchiaiR, Tokimitsu I y Saito I. 2002b. Short-and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*, 15(4), 351-357.

- Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, Yamamoto M, Fujii A, Tokimitsu I y Saito I. 2006. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 24(6), 1065-1073.
- Torino MI, Limón RI, Martínez-Villaluenga C, Mäkinen S, Pihlanto A, Vidal-Valverde C y Frias J. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food chemistry*, 136(2), 1030-1037.
- Tso MO y Jampol LM. 1982. Pathophysiology of hypertensive retinopathy. *Ophthalmology* 89(10):1132-1145.
- Usmani N y Noorani R. 1986. Studies on soybean tempeh. I. Optimization of factors affecting fermentation in commercial production of tempeh with respect to pilot plant studies. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 29:145-147.
- Vahouny GV y Kritchevsky D. 2013. Dietary fiber in health and disease. *Springer Science & Business Media*.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ y Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
- Vargas-Torres A, Osorio-Díaz P, Agama-Acevedo E, Morales-Franco L, Bello-Pérez LA. 2006. Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia* 31(12):881-884.
- Vázquez-Flores AA, Álvarez-Parrilla E, López-Díaz JA, Wall-Medrano A, De la Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de consumo. *Tecnociencia Chihuahua* 6(2):84-93.

- Venereo-Gutiérrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar* 31(2):126-133.
- Wagenknecht A, Mattick L, Lewin L, Hand D,Steinkraus K. 1961. Changes in Soybean Lipids During Tempeh Fermentationa, b. *Journal of Food Science* 26(4):373-376.
- Wall ME, Wani MC, Hughes TJ, y Taylor H. (1988). Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. *Journal of natural products*, 51(5), 866-873.
- Wang HL, Swain E, Wallen L,Hesseltine C. 1975. Free fatty acids identified as antitryptic factor in soybeans fermented by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Nutrition*105:1351-1355.
- Wang M, Simon JE, Aviles IF, He K, Zheng QYy Tadmor Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 601-608.
- Winarno FG. 1986. Production and uses of soybean tempe. *Food Uses of Whole Oil and Protein Seeds*, 102-130.
- Winarno FG y Reddy NR. 1986. Tempe. En: Reddy NR, Pierson MD y Salunkhe DK Editores. Legume-based fermented foods. *CRC Press*, Boca Raton, FL, EUA. Pp 95-117.
- Wiseman H y Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* 313(Pt 1):17.
- Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primatesta P, Stegmayr B,Thamm M. 2004. Hypertension treatment and control

in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 43(1):10-17.

Zamora JD. 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición* 34(1):17-26.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grado (s) Celsius
A	Alfa
AAE	Aminoácidos esenciales
Aw	Actividad de agua
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Aox	Actividad antioxidante
AR	Almidón resistente
AS	Almidón soluble
B	Beta
Bs	Base seca
C	Carbono
Ca	Calcio
CAAE	Contenido de aminoácidos esenciales
Cm	Centímetro
CO ₂	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
Ftot	Fenólicos totales
G	Gramos
GRAS	Generally Recognized as Safe
GOPOD	Glucosa/oxidasa peroxidasa
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)
μL	Microlitro (s)
Mg	Magnesio
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercurio
μM	Micromolar
mM	Milimolar
N	Normal
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro (s)
NPR	Relación neta de proteína
NaOH	Hidróxido de sodio
NO [·]	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
OH [·]	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
\$	Pesos
S	Segundos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Ton	Tonelada (s)
UV	Ultravioleta
V	Voltaje
v/v	Volumen/volumen
Zn	Zinc