



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

“Caracterización del perfil de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido y evaluación de su actividad antiinflamatoria *in vitro*”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de: Maestro en
Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta: **Q.A. Edelí Islas Gómez**

Dirigido por: **Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña**

Santiago de Querétaro, Qro. Octubre, 2015



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

“Caracterización del perfil de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido y evaluación de su actividad antiinflamatoria *in vitro*”

TESIS

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

Presenta:
Q.A. Edelí Islas Gómez

Dirigido por:
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

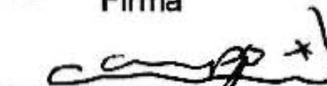
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Secretario


Firma

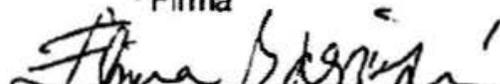
Dra. Rocio Campos Vega
Vocal


Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente


Firma

Dra. Elvira González de Meíja
Suplente


Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una rica fuente de compuestos fenólicos (CF) que incluyen diversos ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales poseen actividades biológicas, como antioxidante, antimutagénica, anticancerígena e hipoglucemiante. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados sobre CF en frijol común se limitan a técnicas de extracción (extractos metanólicos y etanólicos), no permitiendo la caracterización y evaluación de la actividad biológica de CF ligados. En los alimentos, los CF se encuentran como ésteres, glucósidos y polímeros; y para que estos sean liberados es necesario que se sometan a hidrólisis enzimática en el tracto digestivo y en la fermentación colónica. Es por ello, que a través del tracto gastrointestinal tanto el perfil de los CF como sus propiedades biológicas se ven afectados, ya que estos son liberados de la matriz alimentaria o biotransformados. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil de CF y evaluar la capacidad antioxidante del frijol común cocido (*P. vulgaris*, variedad Bayo Madero) a través de la digestión enzimática y fermentación colónica *in vitro*. Así como determinar los metabolitos de fermentación de CF y evaluar la actividad antiinflamatoria de los productos de fermentación colónica sobre macrófagos murinos, usando como marcador la producción de óxido nítrico (NO). Los CF se liberaron principalmente durante la fermentación colónica *in vitro*, donde la capacidad antioxidante (ABTS) también fue la más alta; siendo el extracto de fermentación colónica de 12 h (EF 12h) el que presentó una mayor concentración de CF, así como la más alta capacidad antioxidante (ABTS). Los CF bioaccesibles mostraron correlaciones >0.8919 con la capacidad antioxidante (ABTS) para cada etapa de la digestión enzimática y fermentación colónica *in vitro*. Alrededor del 30 al 40% del total de CF bioaccesibles en intestino delgado fueron absorbidos. El EF de 12h también mostró actividad antiinflamatoria al reducir la producción de NO de manera dosis-dependiente en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), donde el IC_{50} fue del 21.96%. Estos resultados sugieren que las propiedades biológicas asociadas a los CF frijol común, como capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria, se ejercen principalmente en el colon.

(Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, compuestos fenólicos, metabolitos de fermentación, macrófagos e inflamación)

ABSTRACT

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are rich in phenolic compounds (PC), which consumption represents several health benefits and therefore, they have been studied extensively. However, most of the studies in the literature are limited by the extraction technique (methanolic and ethanolic extracts), not allowing the characterization or activity evaluation of the bound polyphenols from common beans. In nature, PC are present in foods mainly as esters, glycosides and polymers; and they need undergo enzymatic hydrolysis in digestive tract and colonic fermentation to be released. Then, the entire digestion process affects the profile and the biological properties of the PC since these compounds are being released and biotransformed. Therefore, the aim of this work was to characterize the PC (HPLC and spectrophotometric techniques) and estimate the antioxidant capacity (ABTS radical scavenging and FRAP) released during enzymatic digestions and *in vitro* colonic fermentation of common beans (*P. vulgaris* cv Bayo Madero); also to determine phenolic metabolites and the anti-inflammatory activity of the colonic fermentation products on RAW 264.7 murine macrophage cell line. PC were released mainly during the *in vitro* colonic fermentation, where the antioxidant capacity (ABTS) was also the highest; colonic fermentation extracts of 12 h (FE 12h) presented the highest concentrations of PC, as well as the antioxidant capacity (ABTS). The PC was positively correlated with the antioxidant capacity (ABTS) during the enzymatic digestions and *in vitro* colonic fermentation ($r > 0.8919$). We found out that roughly 30 to 40% from the total bioaccessible PC in small intestine were absorbed. EF 12h also presented anti-inflammatory activity by the reduction of NO production in dose-dependent manner in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, with IC₅₀ values of 21.96%. Our results suggest that the biological properties associated to the PC from common beans, as antioxidant capacity and anti-inflammatory activity, are exerted mainly in the colon.

(Keywords: *Phaseolus vulgaris*, phenolic compounds, phenolic metabolites, macrophages and inflammation)

DEDICATORIAS

A Dios

A mi hermano Esaú

A mi prometido Daniel

A mis padres Esaú y Emma

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que a pesar de la distancia siempre me han hecho sentir y saber de su cercanía, por sus consejos, su apoyo y amor incondicional. Porque nunca han dejado de orar por mí y estar pendiente de mi andar.

A mi hermano Esaú, que siendo más pequeño se ha hecho presente en mi caminar profesional, asombrándome con sus consejos.

A mi prometido Daniel, que ha estado a mi lado durante esta etapa, acompañándome en momentos alegres y difíciles, por su amor incondicional, por su paciencia y por sus palabras certeras ante las diferentes circunstancias.

A mis amigos Ali, Wendy y Josué, con los que disfrutamos muy gratos momentos, aun cuando las tareas por cumplir parecían complicadas. Gracias Ali, por este tiempo, por ser como una hermana para mí.

A mis compañeros y amigos de generación con los que pudimos avanzar durante esta etapa, llevando una bonita relación, siendo un ejemplo de generación unida.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Liz, Diego, Aurea, Astrid, Nathaly, Dunia, Pablo, Adriana y Kenia; con los compartimos mucho tiempo trabajando, estudiando y preparándonos para diversas situaciones. Por sus consejos, su conocimiento compartido y apoyo.

A la Dra. Flavia Loarca Piña, por su apoyo y confianza desde el comienzo de la maestría, por su integridad, por el conocimiento y tiempo que me brindó, por ser una mentora para mí.

A la Dra. Rocío, por sus aportaciones y conocimiento compartido para llevar a cabo la investigación, por estar pendiente de experimentos montados y de resultados obtenidos.

A la Dra. Sandra y Dra. Marcela, por sus aportaciones en el grupo de trabajo, así como por su apoyo en caso de que se presentará alguna necesidad respecto al proyecto.

A los demás miembros del comité, Dra. Elvira y Dra. Rosalía, por aportaciones al proyecto y por su conocimiento compartido.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme permitido vivir esta etapa de mi vida, por apoyos brindados dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

INDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| INDICE DE CUADROS | i |
| INDICE DE FIGURAS | ii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2 Legumbres | 3 |
| 2.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) | 3 |
| 2.1.1 Generalidades | 3 |
| 2.1.2 Composición química del frijol | 4 |
| 2.1.3 Compuestos biológicamente activos | 7 |
| 2.1.3.1 Compuestos fenólicos..... | 7 |
| 2.1.3.1.1 Flavonoides..... | 9 |
| 2.1.3.1.2 Ácidos fenólicos | 16 |
| 2.1.3.2 Fibra dietética..... | 17 |
| 2.1.3.2.1 Fibra soluble..... | 18 |
| 2.1.3.2.2 Fibra insoluble..... | 19 |
| 2.1.3.3 Fitoesteroles..... | 19 |
| 2.1.3.4 Saponinas | 20 |
| 2.1.4 Compuestos antinutricios..... | 20 |
| 2.2 Fracción no digerible | 21 |
| 2.2.1 Fracción no digerible (FND) en frijol común..... | 21 |
| 2.3 Digestión y absorción de compuestos fenólicos..... | 22 |
| 2.3.1 Digestión..... | 22 |
| 2.3.2 Absorción..... | 25 |
| 2.3.3 Microbiota | 25 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.3.4 | Productos de la fermentación de compuestos fenólicos | 26 |
| 2.3.4.1 | Actividad biológica de los productos de fermentación de los compuestos fenólicos | 27 |
| 2.3.4.1.1 | Actividad antiinflamatoria de ácidos fenólicos | 27 |
| 2.4 | Inflamación y sistema inmune | 28 |
| 2.4.1 | Macrófagos | 28 |
| 2.4.1.1 | Activación de macrófagos | 29 |
| 2.4.1.2 | Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 | 31 |
| III. | JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| IV. | OBJETIVOS..... | 33 |
| 4 | Objetivo general | 33 |
| 4.1 | Objetivos particulares..... | 33 |
| V. | METODOLOGÍA | 34 |
| 5.1 | Materiales..... | 34 |
| 5.1.1 | Compuestos químicos | 34 |
| 5.1.2 | Materia prima | 34 |
| 5.1.3 | Material biológico..... | 34 |
| 5.2 | Métodos | 34 |
| 5.2.1 | Tratamiento térmico del frijol común..... | 34 |
| 5.2.2 | Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 35 |
| 5.2.2.1 | Simulación de las condiciones de la boca..... | 35 |
| 5.2.2.2 | Simulación de las condiciones del estómago..... | 35 |
| 5.2.2.3 | Simulación de las condiciones del intestino delgado | 36 |
| 5.2.2.3.1 | Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas..... | 36 |
| 5.2.2.4 | Fermentación <i>in vitro</i> de la FND..... | 37 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5.2.3 | Composición química | 39 |
| 5.2.4 | Potencial nutracéutico | 39 |
| 5.2.4.1 | Determinación de compuestos fenólicos..... | 39 |
| 5.2.4.1.1 | Extracción metanólica | 39 |
| 5.2.4.1.2 | Fenoles totales (Folin-Cicalteau)..... | 40 |
| 5.2.4.1.3 | Flavonoides totales | 40 |
| 5.2.4.1.4 | Taninos condensados | 40 |
| 5.2.4.1.5 | Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en HPLC 41 | |
| 5.2.4.2 | Identificación y cuantificación de metabolitos de compuestos fenólicos en HPLC..... | 42 |
| 5.2.4.3 | Evaluación de capacidad antioxidante | 42 |
| 5.2.4.3.1 | ABTS..... | 42 |
| 5.2.4.3.2 | FRAP..... | 43 |
| 5.2.5 | Ensayo biológico..... | 43 |
| 5.2.5.1 | Cultivo celular..... | 43 |
| 5.2.5.2 | Ensayo de viabilidad celular..... | 44 |
| 5.2.5.3 | Determinación de la producción de óxido nítrico (NO)..... | 45 |
| 5.2.6 | Análisis estadístico | 45 |
| VI. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 6.1 | Composición química | 46 |
| 6.2 | Potencial nutracéutico | 46 |
| 6.2.1 | Compuestos fenólicos | 46 |
| 6.2.1.1 | Fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados..... | 46 |
| 6.2.1.2 | Ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC | 54 |
| 6.2.2 | Capacidad antioxidante | 65 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6.2.3 | Metabolitos de compuestos fenólicos en el extracto de fermentación colónica (EF)..... | 70 |
| 6.3 | Efecto de EF en el modelo de macrófagos murinos..... | 72 |
| 6.3.1 | Efecto del EF del frijol común cocido sobre la viabilidad celular..... | 73 |
| 6.3.2 | Efecto del EF del frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos. ... | 74 |
| VII. | CONCLUSIONES | 78 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA..... | 79 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|--------|
| 1. Composición de diferentes variedades de frijol común (%). | 5 |
| 2. Clasificación de los compuestos fenólicos..... | 8 |
| 3. Antocianinas reportadas en diferentes variedades de frijol común..... | 12 |
| 4. Flavonoles reportados en diferentes variedades de frijol común. | 14 |
| 5. Composición química de la FND del frijol común cultivar Bayo Madero..... | 22 |
| 6. Métodos de la AOAC utilizados para la cuantificación de los nutrientes | 39 |
| 7. Resultados del análisis proximal de la materia prima | 46 |
| 8. Contenido de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 47 |
| 9. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) de ácidos fenólicos y flavonoides durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> mediante HPLC-DAD..... | 55 |
| 10. Capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 66 |
| 11. Correlaciones entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante..... | 68 |
| 12. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) de metabolitos de compuestos fenólicos en extractos de fermentación colónica <i>in vitro</i> mediante HPLC-DAD..... | 71 |
| 13. Medición del pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> | 72 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Principales partes de la estructura del grano de frijol común | 4 |
| 2. Estructura del fenol..... | 7 |
| 3. Estructura básica de los flavonoides | 9 |
| 4. Estructura del pirano, pirilium y pirona..... | 10 |
| 5. Esqueleto de los isoflavonoides y de los neoflavonoides | 10 |
| 6. Estructuras del ácido cinámico y ácido 5-hidroxiferúlico..... | 16 |
| 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 49 |
| 8. Contenido de taninos condensados durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 52 |
| 9. Absorción de compuestos fenólicos en condiciones de intestino delgado. | 54 |
| 10. Concentración de ác. caféico durante la digestión <i>in vitro</i> | 57 |
| 11. Concentración de ác. clorogénico durante la digestión <i>in vitro</i> | 58 |
| 12. Concentración de ác. cumárico durante la digestión <i>in vitro</i> | 59 |
| 13. Concentración de ác. ferúlico durante la digestión <i>in vitro</i> | 60 |
| 14. Concentración de ác. gálico durante la digestión <i>in vitro</i> | 61 |
| 15. Concentración de (+)-catequina durante la digestión <i>in vitro</i> | 62 |
| 16. Absorción de ácidos fenólicos y (+)-catequina en condiciones de ID. | 65 |
| 17. Capacidad antioxidante (ABTS) durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 67 |
| 18. Capacidad antioxidante (FRAP) durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 69 |
| 19. Efecto del EF sobre la viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 | 73 |
| 20. Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS | 75 |
| 21. Concentración media inhibitoria de NO para EF 12 h en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS | 76 |

I. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las principales leguminosas presentes en todo el mundo (Jati *et al.*, 2013). En México, América Latina y África es consumido como un alimento básico (Luthria y Pastor-Corrales, 2006). Se conoce bien que el frijol común es una buena fuente de proteínas, así como de carbohidratos, vitaminas y minerales (de Almeida Costa *et al.*, 2006; Siddiq *et al.*, 2010). En los últimos años, se ha incrementado la atención sobre esta leguminosa como un alimento nutracéutico, debido a su contenido de fitoquímicos con beneficios potenciales a la salud, como fibra dietética, compuestos fenólicos, péptidos, saponinas, entre otros (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Campos-Vega *et al.*, 2010).

Dentro de los compuestos fenólicos que presenta el frijol común, incluyen una gran variedad de flavonoides como antocianinas, flavonoles y proantocianidinas; así como una amplia gama de ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, *p*-cumárico y gálico (Beninger y Hosfield, 2003; Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005b). Se ha demostrado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, que estos compuestos presentan actividades biológicas como: antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antiinflamatoria, entre otras; las cuales se han relacionado con una disminución en enfermedades no transmisibles (Cardador-Martínez *et al.*, 2002b; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a; Aparicio-Fernández *et al.*, 2006; Macz-Pop *et al.*, 2006; García-Lafuente *et al.*, 2014)

Sin embargo, tanto la caracterización como la evaluación de la actividad biológica de los CF del frijol común se han realizado a partir de extractos de frijol sin tomar en cuenta el proceso de digestión. Una vez que los compuestos fenólicos son ingeridos, sufren biotransformaciones en su paso a través del tracto gastrointestinal, debido a las diferentes condiciones que existen en boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso; lo que sin duda modifica el perfil de CF, afectando tanto la bioaccesibilidad como la actividad biológica de los mismos (Monagas *et al.*, 2010; Cardona *et al.*, 2013).

Se ha reportado que alrededor del 90-95% del total de CF de la dieta, escapan la degradación por enzimas intestinales, llegando al colon para ser fermentados o liberados por la microbiota asociada (Clifford, 2004). Algunos de los productos de fermentación colónica de los CF son los derivados de los ácidos hidroxifenilacético e hidroxifenilpropiónico, los cuales se han estudiado a partir de otros sustratos y se ha informado que presentan diversas actividades biológicas entre ellas la antiinflamatoria (Larrosa *et al.*, 2009; Monagas *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el grupo de trabajo se ha estudiado la fracción no digerible (FND) de frijol común y se ha reportado que presenta importantes cantidades de CF; sin embargo, estos no se han caracterizado ni se les ha dado un seguimiento en la fermentación colónica (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010).

Es por ello, que en este trabajo se dio un seguimiento a los CF durante una simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*, caracterizando en cada etapa de la digestión a los CF y evaluando la capacidad antioxidante de toda la matriz del frijol común cocido (*P. vulgaris*, variedad Bayo Madero). Así como, determinando los metabolitos de fermentación de los CF y evaluando la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los productos de fermentación sobre macrófagos murinos.

II. ANTECEDENTES

2 Legumbres

El término legumbre abarca a más de 13 000 especies diferentes, todas de la familia *Leguminosae*. Estas desempeñan un papel importante en la dieta de los humanos en todo el mundo (Zhou *et al.*, 2013), especialmente en regiones de Latinoamérica, África y Subcontinente asiático, debido a que son una rica y económica fuente de proteínas. También se les considera una buena fuente de carbohidratos, vitaminas del complejo B y minerales (Jood *et al.*, 1988). Existen alrededor de 20 especies de legumbres que son utilizadas como granos secos en cantidades sustanciales para la alimentación humana (de Almeida Costa *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008). De las más importantes que usan para el consumo humano son soya, cacahuate, frijoles, chícharos, lentejas, garbanzos y habas (Rochfort y Panozzo, 2007; Zhou *et al.*, 2013).

2.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.1.1 Generalidades

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es miembro de Leguminosae, familia Phaseoleae, subfamilia Papolionoideae (Bressani, 1993; Graham y Ranalli, 1997). En base a evidencias cronológicas, arqueológicas, botánicas y lingüísticas, se reconoce que fue domesticado y originado en América (Papa y Gepts, 2003; Papa *et al.*, 2005); aunque actualmente su consumo se extiende por todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo (Shimelis y Rakshit, 2005).

El frijol común es una de las principales leguminosas presentes en todo el mundo, es el tercero en importancia después de la soya (*Glycine max* L. Merr.) y el cacahuate (*Arachis hipogea* L.) (Watson & Preedy, 2013). En México y en países de Centroamérica, Sudamérica y África, es consumido como un alimento básico y la ingesta *per cápita* puede llegar a extenderse hasta 40 kg por año (Leterme y Carmenza Muñoz, 2002; Luthria y Pastor-Corrales, 2006). Brasil y México se ubican entre los principales países productores de esta leguminosa para consumo

nacional (Jati *et al.*, 2013). En la Figura 1 se muestra la estructura de grano de frijol común.

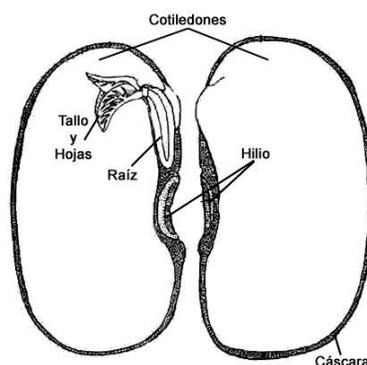


Figura 1. Principales partes de la estructura del grano de frijol común
De SDHM (s.f.)

2.1.2 Composición química del frijol

El frijol común es reconocido como buena fuente de proteínas, presenta de 2 a 3 veces más que los cereales (Siddiq *et al.*, 2010). También posee cantidades considerables de almidón, fibra dietética, vitaminas y minerales (Kutoš *et al.*, 2003; de Almeida Costa *et al.*, 2006). Además de estos componentes, el frijol común es una rica fuente de fitoquímicos, con una amplia gama de compuestos fenólicos, tales como antocianinas, flavonoides, proantocianidinas, flavonoles, ácidos fenólicos, e isoflavonas (Beninger y Hosfield, 2003; Chung *et al.*, 2003; Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005; Granito *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008). Su uso se ha asociado a beneficios fisiológicos como en la prevención de enfermedades no transmisibles, como cardiovasculares, obesidad, diabetes mellitus y cáncer (Jenkins, 2007; Chung *et al.*, 2008). La composición química del grano de frijol común se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de diferentes variedades de frijol común (%).

| Frijoles | Carbohidratos | Proteínas | Lípidos | Cenizas | Referencias |
|---------------------|---------------|-------------|-----------|-----------|-------------------------------|
| <i>Haricot</i> | 56.53-61.56 | 17.95-22.07 | 0.66-1.02 | 2.83-4.26 | (Shimelis y Rakshit, 2005) |
| <i>Red kidney</i> | 53.2 | 25.3 | 2 | 3.3 | (Ojijo <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Tirga</i> | 51.5 | 26.8 | 2.1 | 4.8 | (Amir <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>White kidney</i> | 59.62 | 25.63 | 1.44 | 3.55 | (Güzel y Sayar, 2012) |
| <i>Pinto</i> | 57.3 | 30.1 | 1.8 | 4.9 | (Amir <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Red haricot</i> | 50.4 | 27.1 | 2.8 | 4.1 | (Ojijo <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Navy</i> | 54.3 | 18.15 | 2.63 | 4.14 | (Sai-Ut <i>et al.</i> , 2009) |

Adaptado de Hayat *et al.* (2014)

- Carbohidratos

Los carbohidratos son el componente mayoritario del frijol común, en peso seco representan alrededor del 50 al 76% (Guzman & Paredes-López, 1998; Vargas-Torres, *et al.*, 2004; Paredes, *et al.*, 2006a; Reynoso-Camacho, *et al.*, 2006; Ovando-Martinez, *et al.*, 2011). La mayoría de estos son carbohidratos complejos como almidón y fibra dietética. En leguminosas el almidón puede constituir hasta el 40% del peso seco de la semilla (Guillon & Champ, 2002; Osorio-Díaz, *et al.*, 2004). El frijol común crudo contiene de 16-19% de fibra dietética y el cocido de 23-27%; esta fibra está constituida principalmente por pectinas, arabinogalactanos y xiloglucanos (Paredes, *et al.*, 2006a).

La fracción de azúcares en frijol (mono, di y oligosacáridos), tales como rafinosa, estaquiosa y verbascosa, es significativamente menor del 2 al 6% en peso seco (Paredes-Lopez *et al.*, 2006a).

- Proteínas

El frijol común es una excelente fuente de proteínas, su contenido se ubica entre 18-30% (Cuadro 1). La fracción mayoritaria la constituyen globulinas, que abarcan del 50-70% del total de las proteínas del frijol (Tang y Sun, 2011). Contrario a otras legumbres, este presenta un alto contenido de glutelinas (20-30%) (Seena *et al.*,

2005; Słupski, 2010). También presenta prolamina y aminoácidos libres, con un contenido de 2-4% y 5-9%, respectivamente (Derbyshire, *et al.*, 1976; Ma & Bliss, 1978).

Una de las características benéficas importantes de la proteína del frijol común, es su alto nivel de lisina; sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados y triptófano (Paredes-Lopez *et al.*, 2006a). Es por ello, que las proteínas del frijol común y de cereales son nutricionalmente complementarias con respecto a sus aminoácidos esenciales (Broughton *et al.*, 2003; Iqbal *et al.*, 2006; Słupski, 2010).

- Lípidos

El contenido de lípidos en frijol común es aproximadamente del 2% (Cuadro 1) (Mabaleha y Yeboah, 2004). Los fosfolípidos y triacilglicéridos son los componentes lipídicos mayoritarios, aunque también puede presentar en menores cantidades diacilgliceroles, hidrocarburos y estéril ésteres (Yoshida *et al.*, 2005).

El frijol común es considerado como una fuente esencial de ácidos grasos insaturados, el 61.1% del total de ácidos grasos son palmítico (16:0), oleico (18:1), y linoleico (18:2) (Campos-Vega *et al.*, 2010). El ácido linoleico (18:3) cuenta con 43.1% del total de ácidos grasos en frijol (Grela y Günter, 1995).

- Vitaminas y minerales

El frijol común es una fuente esencial de micronutrientes, tales como vitaminas y minerales, se considera que es fuente superior a la de los cereales (Welch *et al.*, 2000). Incluso, el frijol común tiene un contenido más alto de minerales que otras legumbres; contiendo una importante cantidad de hierro, zinc, cobre, fósforo, y aluminio (Broughton *et al.*, 2003; Shimelis y Rakshit, 2005). Los niveles de hierro en frijol común son de 62.0-150 µg/g y se encuentra en forma no hemo (Elhardallou y Walker, 1992; Vadivel y Janardhanan, 2000). Mientras que, los niveles de zinc, cobre y aluminio en diferentes variedades de frijol común se encuentran entre 10.1-109, 2.8-10.9 y 6.7-14.4 µg/g, respectivamente (Holland *et al.*, 1992; Ojijo *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005).

También se considera que el frijol común es una fuente importante de vitaminas; como tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, y ácido fólico, las cuales se encuentran en frijol común crudo en intervalos de 0.81-1.32, 0.112-0.411, 0.85-3.21, 0.299-0.659, y 0.148-0.676 mg/100 g, respectivamente (Augustin *et al.*, 1981; Paredes-Lopez *et al.*, 2006a; Campos-Vega *et al.*, 2010).

2.1.3 Compuestos biológicamente activos

En los últimos años ha incrementado la atención en el frijol común como un alimento nutracéutico, ya que contiene una alta variedad de fitoquímicos con potencial benéfico a la salud, tales como compuestos fenólicos, fibra dietética, fitoesteros, saponinas, péptidos y, alcaloides, entre otros (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Campos-Vega *et al.*, 2010).

2.1.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático. El fenol es la estructura sobre la cual se basa todo el grupo (Figura 2). El anillo aromático en este caso es el benceno. Los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y son un grupo que por lo general se encuentra como esteres o glicósidos en lugar de compuestos libres (Vermerris y Nicholson, 2008).

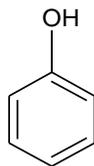


Figura 2. Estructura del fenol

- Clasificación

El término fenólicos cubre a muchos y diversos grupos de compuestos químicos. Estos compuestos pueden ser clasificados de distintas maneras. Harbone y Simmonds (1964) clasificaron estos compuestos en grupos basándose en el número de carbonos en la molécula, como se muestra en el en el Cuadro 2 (Vermerris y Nicholson, 2008).

Cuadro 2. Clasificación de los compuestos fenólicos

| Estructura | Clase fenólica |
|---|--|
| C ₆ | Fenoles simples |
| C ₆ -C ₁ | Ácidos benzoicos y compuestos relacionados |
| C ₆ -C ₂ | Acetofenonas y ácidos fenilacéticos |
| C ₆ -C ₃ | Ácidos cinámicos y relacionados |
| C ₆ -C ₃ | Cumarinas y relacionados |
| C ₁₅ | Chalconas, auronas, dehidrochalconas |
| C ₁₅ | Flavanos |
| C ₁₅ | Flavonas |
| C ₁₅ | Flavanonas |
| C ₁₅ | Flavonoles |
| C ₁₅ | Antocianidinas |
| C ₁₅ | Antocianinas |
| C ₃₀ | Biflavonoides |
| C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆ | Benzofenonas, estilbenos; xantonas |
| C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄ | Quinonas |
| C ₁₈ | Betacianinas |
| Lignanós, neolignanós | Dímeros o oligómeros |
| Lignina | Polímeros |
| Taninos | Oligómeros o polímeros |
| Flobafenos | Polímeros |

Vermerris y Nicholson (2008)

El frijol común presenta varios compuestos fenólicos, que incluyen a una gran variedad de flavonoides como antocianinas, flavonoles, proantocianidinas, así como una amplia gama de ácidos fenólicos (Beninger y Hosfield, 2003; Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005b). Estos compuestos se encuentran principalmente en la cubierta de las semillas, y se pueden encontrar en pequeñas cantidades en los cotiledones (González de Mejía, *et al.*, 1999). Golam Masu *et al.* (2011) observó en diferentes variedades de frijol común, variaciones en el contenido total de polifenoles que se ubicaban entre 5.87-14.14 mg/g. En otras variedades como en *red kidney* y negro se presentaron concentraciones de fenoles totales de 4.98 y 5.04 mg/g, respectivamente (Xu y Chang, 2007).

2.1.3.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos C_{15} , todos tienen la estructura $C_6-C_3-C_6$. Estos pueden agruparse en tres grandes clases basándose en su estructura general: chalconas, auronas y flavonoides. En cada caso, los dos anillos de benceno se encuentran unidos por un grupo de tres carbonos. El arreglo del grupo C_3 es lo que determina como clasificar a los compuestos. Los flavonoides (Figura 3) tienen un anillo A, B y C, y por lo general se representan con el anillo A en el lado izquierdo (Vermerris y Nicholson, 2008).

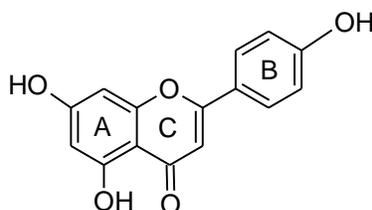


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides

En típicos flavonoides uno de los grupos *meta*-hidroxil del anillo A aporta el oxígeno al heterociclo de seis átomos. El heterociclo de oxígeno de seis miembros de los flavonoides puede ser un pirano, pirilium, o un anillo pirona (Figura 4). El anillo B es típicamente mono-hidroxilado, *orto*-dihidroxilado, o *vic*-trihidroxilado. El anillo B también puede tener metil-éteres como sustituyentes. Las flavanonas, los

flavonoles, las flavonas, las antocianidinas, y las antocianinas integran al grupo de la flavonoides (Vermerris y Nicholson, 2008).

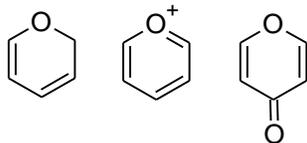


Figura 4. Estructura del pirano, pirilium y pirona

También las isoflavonas, isoflavanonas y los neoflavonoides son miembros del grupo flavonoide (Figura 5). Todos ellos tienen la estructura C6-C3-C6 pero el anillo B está en diferente posición con respecto al oxígeno del heterociclo (Vermerris y Nicholson, 2008).



Figura 5. Esqueleto de los isoflavonoides y de los neoflavonoides

Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos ricos en flavonoides protegen contra enfermedades asociadas con estrés oxidativo, como enfermedades coronarias y cáncer (Bagchi *et al.*, 1998; Youdim *et al.*, 2000), protección contra el daño causado por irradiación de las células (Kondo *et al.*, 2004), protección contra la transformación celular inducido por productos químicos (Hou *et al.*, 2004), y selectiva actividad inhibidora del crecimiento de células cancerosas (Rafi *et al.*, 2002; Katsube *et al.*, 2003; Lazzè *et al.*, 2004).

La actividad biológica de los flavonoides depende del tipo de constituyentes fitoquímicos que contenga, de la complejidad de sus estructuras (Hou *et al.*, 2004; Lazzè *et al.*, 2004) y de la composición de la mezcla de flavonoides, ya que se ha demostrado que mezclas complejas de fitoquímicos podrían proporcionar beneficios a la salud por efectos sinérgicos que se llevan a cabo entre ellos (Shafiee *et al.*, 2002; Seeram *et al.*, 2004).

El frijol común contiene una amplia variedad de flavonoides, incluyendo flavonoles y sus glucósidos, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas; la presencia de estos en el frijol común determina su color (Takeoka *et al.*, 1997; Beninger y Hosfield, 2003; Choung *et al.*, 2003; Romani *et al.*, 2004; Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005; Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Macz-Pop *et al.*, 2006). El grupo de flavonoides más ampliamente distribuido en los frijoles es el de las proantocianidinas, las cuales se han encontrado en diversas variedades de frijol común (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1996; González de Mejía, *et al.*, 1999; Beninger y Hosfield, 2003); mientras que, la presencia de antocianinas sólo se ha reportado en variedades de frijol común negro y azul-violeta (Beninger y Hosfield, 2003; Romani *et al.*, 2004).

Se ha demostrado actividad biológica de los flavonoides de frijol común en modelos *in vitro* e *in vivo*; antocianinas y proantocianidinas han mostrado actividad antioxidante (Tsuda *et al.*, 1994; Cardador-Martínez *et al.*, 2002b; Beninger y Hosfield, 2003) y antimutagénica (González de Mejía, *et al.*, 1999; Cardador-Martínez *et al.*, 2002a; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a). Y se identificó que el frijol común rojo tenía una de las más altas capacidades antioxidantes entre 100 frutas y vegetales examinados (Wu *et al.*, 2004). Espinosa-Alonso *et al.* (2006) reportaron para diferentes variedades de frijol común silvestre mexicano, concentraciones de flavonoides desde 7.72 hasta 106.48 mg/kg de harina.

2.1.3.1.1.1 Antocianinas

Las antocianinas han sido reportadas como compuestos antiinflamatorios, vasotónicos y antioxidantes, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas tales como cáncer, alzheimer y cardiovascular (Rice-Evans y Packer, 1998; Macz-Pop *et al.*, 2006).

La presencia de antocianinas en frijol común sólo se ha reportado en variedades negro y azul-violeta (Beninger y Hosfield, 2003; Romani *et al.*, 2004). Espinosa-Alonso *et al.*, (2006) determinaron el contenido antocianinas totales en diferentes variedades de frijol común, obteniendo cantidades desde 0.01 hasta 1.85 mg de

equivalentes de 3-glucósido de cianidina (3GC)/g de harina; donde los valores más altos se reportaron en cubiertas de frijol común negro. En el Cuadro 3 se presenta algunas de las antocianinas reportadas en diferentes variedades de frijol común.

Cuadro 3. Antocianinas reportadas en diferentes variedades de frijol común.

| Antocianina | Variedad de frijol común | Referencia |
|-------------------------------|--------------------------|---|
| 3-glucósido de delphinidina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| | <i>Black group</i> | (Beninger y Hosfield, 2003; Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| | <i>Red kidney</i> | (Choung, <i>et al.</i> , 2003; Takeoka, <i>et al.</i> , 1997) |
| 3-glucósido de petunidina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| | <i>Black group</i> | (Beninger y Hosfield, 2003; Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| | <i>Red kidney</i> | (Choung, <i>et al.</i> , 2003; Takeoka, <i>et al.</i> , 1997) |
| 3-glucósido de malvidina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| | <i>Black group</i> | (Beninger y Hosfield, 2003; Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| 3-glucósido de cianidina | <i>Red kidney</i> | (Takeoka, <i>et al.</i> , 1997) |
| | <i>Red kidney</i> | (Choung, <i>et al.</i> , 2003) |
| | <i>Small red</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| 3-glucósido de pelargonidina | <i>Red kidney</i> | (Choung, <i>et al.</i> , 2003) |
| | <i>Small red</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| 3,5- diglucósido de cianidina | <i>Red kidney</i> | (Choung, <i>et al.</i> , 2003) |
| diglucósido de petunidina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| diglucósido de malvidina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| diglucósido de pelargonidina | <i>Black</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |

Lin *et al.* (2008) estudiaron el perfil de compuestos fenólicos en 24 muestras de frijol común. Encontraron que sólo dos variedades distribuidas en el mercado

contenían antocianinas (frijol común negro y mexicano rojo). El grupo de los frijoles negros contenían principalmente el 3-O-glucósido de delphinidina, petunidina, y malvidina.

Espinosa-Alonso *et al.* (2006) determinaron la composición fenólica en 62 colecciones de frijoles mexicanos silvestres y en dos frijoles cultivados de diversos orígenes y diferentes colores de la cubierta de la semilla. Después de realizar una hidrólisis detectaron a las antocianinas delphinidina, petunidina, cianidina, malvidina, pelargonidina, y peonidina. Y ellos asumiendo que estas seis antocianinas representaban el 100%, calcularon los porcentajes para cada antocianina en todas las colecciones, dando los siguientes porcentajes: delphinidina, 48.5-81.0%; petunidina, 3.7-31.8%; cianidina 0.9-22.5%; malvidina, 3.9-14.2%; pelargonidina, 0.4-6.5%, y peonidina, 0.5-3.7%. Se encontró que el contenido de antocianinas fue más altos en semillas de frijoles negros que en los de frijoles grises o de mezclas heterogéneas.

2.1.3.1.1.2 Flavonoles

En general, los flavonoles y otros compuestos fenólicos del género *Phaseolus* se almacenan en la cubierta de la semilla por las siguientes razones: estos compuestos se caracterizan por tener actividad antipatógena y antialimentaria, además de que su localización asegura la mejor protección de la semilla contra ataques externos (patógenos e insectos) (Dinelli *et al.*, 2006). Los flavonoles son antioxidantes y quelantes, con varios efectos benéficos a la salud humana (Heim *et al.*, 2002). Se ha reportado que kaempferol y formas conjugadas que se relacionan, ejercen actividad contra el cáncer (Di Carlo *et al.*, 1999).

Dinelli *et al.* (2006), determinaron el contenido de flavonoides en 23 ecotipos de frijol común, que provenían de tres áreas. Encontraron que en las cubiertas de las semillas se presentaban flavonoides glicosilados, las concentraciones de más altas a más bajas fueron las siguientes: 3-O-glucósido de kaempferol, 3-O-xilosilglucósido de kaempferol y un monoglucósido kaempferol no identificado. El contenido total de flavonoles varió desde 0.19 a 0.84 g/kg de semilla en peso

fresco. Espinosa-Alonso *et al.* (2006) reportaron que en todas las variedades de frijol común mexicano silvestre se presentaron los flavonoles kaempferol y quercetina, con concentraciones entre 2.19-98.57 y 2.08-58.58 mg/kg de harina, respectivamente. En el Cuadro 4 se presentan reportes de algunos flavonoles de frijol común.

Cuadro 4. Flavonoles reportados en diferentes variedades de frijol común.

| Flavonoles | Variedad de frijol común | Referencia |
|----------------------------|---|---|
| Kaempferol | <i>Pinto group</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| glucósido de kaempferol | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| 3- glucósido de kaempferol | <i>Black and Pinto bean group, small read</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| glucósido de miricetina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| 3- glucósido de miricetina | <i>Black group</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| 3-glucósido de quercetina | <i>Black Jamapa</i> | (Aparicio-Fernandez, <i>et al.</i> , 2005b) |
| | <i>Black and Light red group</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| Diglucósido de quercetina | <i>Dark red kidney, Light red group</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |
| Diglucósido de kaempferol | <i>Dark red kidney, small red group</i> | (Lin <i>et al.</i> , 2008) |

2.1.3.1.1.3 Proantocianidinas

Las proantocianidinas o taninos condensados, comprenden un grupo de oligómeros y polímeros del tipo polihidroxiflavan-3-ol, los cuales se sintetizan a través de la vía de flavonoides (Dixon *et al.*, 2005); y se encuentran unidas por enlaces carbono-carbono entre las subunidades de flavonol (Schofield *et al.*, 2001). El nombre de proantocianidinas refleja el hecho de que los taninos al ser sometidos a calor en una solución ácida (hidrólisis ácida), producen antocianidinas coloridas (Dey y Harbone, 1989).

Los taninos representan una amplia gama de compuestos polifenólicos que varían en tamaño, tipos de enlaces, composición monomérica y contenido a través de las diferentes especies de plantas, tejidos, y estados de desarrollo (Marles *et al.*, 2003). Se conoce que estos compuestos juegan diversos roles ecológicos y nutricionales (Makkar *et al.*, 1999). Por ejemplo, los taninos que se acumulan en las hojas tienen una importante función en prevenir herbivoría de insectos; mientras que, los taninos en la cubierta de la semilla funcionan contra infecciones por hongos (Kantar *et al.*, 1996; Winkel-Shirley, 2001). En términos nutricionales, la presencia de múltiples grupos hidroxilo en taninos condensados, lleva a la formación de complejos con proteínas (Naczki *et al.*, 1996; Hagerman *et al.*, 1998), iones metálicos (Scalbert, 1991; Reed, 1995; McDonald *et al.*, 1996; Foo *et al.*, 1997), y polisacáridos (Barahona *et al.*, 1997), influyendo en la absorción dietética de cada uno de estos nutrientes.

Estudios realizados con animales, muestran que un alto porcentaje de taninos en la dieta, afecta negativamente la digestibilidad de proteínas y carbohidratos, reduciendo la ganancia de peso y eficiencia en absorción de nutrientes (Terrill *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Barahona *et al.*, 1997). De igual manera, sus efectos antinutricionales en cereales y legumbres, muestran una reducción en la calidad de estos alimentos para el consumo humano (Reddy *et al.*, 1985; Cabrera y Martin, 1989). Por ejemplo, se conoce que los taninos de legumbres precipitan proteínas y forman complejos con iones de hierro en el lumen gastrointestinal, reduciendo de esta forma la absorción, digestibilidad y por tanto, la biodisponibilidad de estos nutrientes (Brune *et al.*, 1989; Marles *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior, los taninos pueden funcionar como compuestos anticancerígenos y antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1997; Takeoka *et al.*, 1997; Beninger *et al.*, 1998; Dangles *et al.*, 2000).

En la semilla del frijol común, las proantocianidinas se encuentran principalmente en la cubierta, estas ayudan a determinar el color, matiz e intensidad de la semilla (Beninger *et al.*, 1998). Se considera que es el grupo de flavonoides más ampliamente distribuido en los frijoles (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1996; Beninger

y Hosfield, 2003; González de Mejía *et al.*, 2003). Se han detectado en diferentes variedades de frijol común, obteniendo rangos de 9.4 a 37.8 mg de equivalentes de catequina (ECA)/g (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1996; Cardador-Martínez *et al.*, 2002a; Beninger y Hosfield, 2003; González de Mejía *et al.*, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

Díaz *et al.*, (2010), analizaron los niveles de taninos condensados en frijol común, usando métodos de HPLC y espectrofotométricos. Para las muestras analizadas, el promedio general de taninos condensados en las cubiertas de las semillas fue de 20.04%. Los rangos para taninos solubles (TS) fueron entre 8.0-27.9%, para taninos insolubles (TI) 1.5-5.4%, y para taninos totales (TT) 10.7%-30.9%. Los taninos condensados se componían de unidades monoméricas de catequina (60.3%), galocatequina (25%), y afzelequina (14.7%).

2.1.3.1.2 Ácidos fenólicos

Es un grupo ampliamente distribuido, hay seis ácidos cinámicos que son lo más comunes, los cuales tienen un esqueleto C₆-C₃, estos son el ácido cinámico, el ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico y ácido sinápico (Figura 6). Todas las plantas probablemente contienen al menos tres de ellos. Los ácidos cinámicos por lo general se encuentran en las plantas como ésteres del ácido quínico, siquímico y tartárico. Por ejemplo, el ácido clorogénico es un éster de ácido caféico y quínico. Los ésteres cinámicos también se encuentran como ésteres de azúcar, o como ésteres de una variedad de otros ácidos orgánicos (Vermerris y Nicholson, 2008).



Figura 6. Estructuras del ácido cinámico y ácido 5-hidroxiferúlico

En diferentes variedades frijol común seco Luthria y Pastor-Corrales (2006) estudiaron el contenido de 16 ácidos fenólicos; de los cuales detectaron y cuantificaron ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico en todas las variedades seleccionadas. El ácido caféico destacó por su contenido en sólo dos variedades de frijol común negro (T-39 y Eclipse). El promedio del contenido de ácidos fenólicos en las muestras de frijol común seco fue de 31.2 mg/100 g; y el contenido de los mismos varió entre todas las muestras desde 19.1 hasta 48.3 mg/100 g. El ácido ferúlico fue el más abundante en todas las muestras; mientras que de ácido *p*-cumárico y sinápico, se extrajeron niveles intermedios para todas las muestras.

Lin *et al.* (2008) reportan que sus muestras frijol común, tanto antes como después de hidrolizarse, presentaron perfiles similares de ácidos hidroxicinámicos. Entre estos se encuentran los ácidos ferúlico, sinápico, *p*-cumárico; así como, sus derivados (hidroxicinamatos).

Espinosa-Alonso *et al.* (2006) también estudiaron la composición fenólica en diferentes variedades de frijol común. Cuantificaron ácidos fenólicos totales, obteniendo rangos de 49.56 a 131.18 mg/kg de harina; sugirieron que estos se presentan principalmente en las cubiertas de las semillas. Los principales ácidos fenólicos que se encontraron fueron el ácido ferúlico, vainillínico, *p*-hidroxibénzoico y sinápico; y en menores cantidades aldehído de vainillina, ácido caféico, siríngico, y *p*-cumárico. También mencionan, que no observaron una relación entre el contenido de ácidos fenólicos y el color de los grupos de frijol común; sin embargo, encontraron que las colecciones grises tenían una más alta cantidad de ácido *p*-hidroxibénzoico, vainillínico, caféico, aldehído de vainillina y ácido ferúlico que las otras de diferente color.

2.1.3.2 Fibra dietética

La fibra se define como la fracción de los alimentos derivada de la pared celular de las plantas, que resisten la hidrólisis por las enzimas digestivas en humanos, llegando al colon sin haber sido absorbido en el intestino humano sano, donde

pueden ser hidrolizados y fermentados por la flora colónica (Ha *et al.*, 2000; Peris *et al.*, 2002), estimulando el crecimiento de esta flora y producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido acético, propiónico y butírico (Roberfroid, 2001; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008).

El frijol común cocido contiene alrededor del 26% de fibra, mientras que el crudo entre el 16-17% (Paredes-López y Valverde-González, 2006b). Esta leguminosa es rica en carbohidratos amiláceos y polisacáridos no amiláceos; estos últimos incluyen fibra dietética, pectinas, gomas, hemicelulosa, inulina, entre otros (Hoover y Zhou, 2003). Los principales componentes de la fibra dietética son carbohidratos complejos (almidón resistente, pectina, oligosacáridos) y lignina (Roberfroid, 2001).

La fibra dietética tiene beneficios a la salud, incluyendo el efecto laxante, atenuación de colesterol y glucosa en la sangre, y el incremento de pérdida fecal de ácidos biliares. Se ha reportado que su consumo disminuye el riesgo de enfermedades crónicas, como cardiovasculares y diabetes (Kutoš *et al.*, 2003; Peñalver *et al.*, 2007).

2.1.3.2.1 Fibra soluble

La fibra soluble se constituye de gomas, pectinas, mucílagos, insulina, almidón resistente y oligosacáridos como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Este tipo de fibra es viscosa y fermentable (Valenzuela y Maiz, 2006), al estar en contacto con el agua forma un retículo donde queda atrapada, originando soluciones de viscosidad alta (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Es por ello, que ejerce un papel importante en la estabilización de los niveles de glucosa en sangre y la concentración de insulina postprandial; y en la disminución de los niveles de colesterol sérico asociado a la pérdida de ácidos biliares vía materia fecal (Roberfroid, 2001; da S Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

Cuando las bacterias colónicas la fermentan produce ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido acético, propiónico y butírico; los cuales ayudan a

disminuir fosas cripticas aberrantes (Younes *et al.*, 2001; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008).

2.1.3.2 Fibra insoluble

En frijol común la fibra insoluble representa entre el 92-100% de la fibra dietética, esta se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Bednar *et al.*, 2001; Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006).

La fibra insoluble no es viscosa, es escasamente fermentable (Valenzuela y Maiz, 2006) y retiene agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; lo cual produce un aumento de la masa fecal acelerando el tránsito intestinal; esto contribuye en la disminución de la concentración y del tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006).

2.1.3.3 Fitoesteroles

En legumbres, los fitoesteroles se encuentran en bajas cantidades; los más comunes son: β -sitoesterol, campesterol y estigmasterol (Benveniste, 1986). Weihrauch y Gardner (1978) reportaron para frijol común *kidney* niveles de fitoesterol de 127 mg/100 g. Ryan *et al.*, 2007 reportaron el contenido de fitoesteroles, para frijol común *kidney* 134 mg/100 g de fitoesterol; 86.2 mg/100 g de β -sitoesterol, 6.5 mg/100 g de campesterol y 41.4 mg/100 g de estigmasterol.

Varios estudios han demostrado la eficacia de esteroides y estanoles de las plantas en la reducción de niveles de colesterol en sangre, por esta razón, los esteroides de planta han sido incorporados en diversos alimentos (Gylling y Miettinen, 2005; Thompson y Grundy, 2005). Un estudio mostró que el consumo de legumbres (frijoles, lentejas y guisantes) disminuye las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) en suero; y concluye en que las saponinas pueden contribuir a este efecto, la cual es hidrolizada por bacteria intestinal a diosgenina, que puede ejercer un efecto positivo (Fenwick y Oakenfull, 1983; Thewles *et al.*, 1993).

2.1.3.4 Saponinas

Las saponinas de soya son las más estudiadas y se clasifican como A, B o E en base a su estructura química de aglicona (Rochfort y Panozzo, 2007). El contenido total de saponinas para diferentes variedades de frijol común, puede ser de 0.1 hasta 16 g/kg de frijol común seco (Khokhar y Chauhan, 1986; Price *et al.*, 1987; Cheeke, 1989).

Guajardo-Flores *et al.* (2013) de saponinas como soyasaponina Af, deacetil soyasaponina Af, soyasaponina α g y soyasaponina β g en la cubierta seca del frijol común negro, con cantidades de 0.65, 0.33, 0.38 y 0.28 mg/g de extracto, respectivamente. En el mismo trabajo se reportó que la cubierta de frijol común negro germinada hasta el tercer día presentaba soyasaponina Af, deacetil soyasaponina Ae, soyasaponina Ba y soyasaponina α g, con concentraciones de 1.45, 0.28, 0.35 y 0.40 mg/g de extracto.

Investigaciones recientes sugieren que las saponinas de las legumbres pueden poseer actividad anticancerígena (Shi *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006; Ellington *et al.*, 2006) y ser benéficas para la hiperlipidemia (Shi *et al.*, 2004). Las saponinas y flavonoides encontrados en frijol común han sido ampliamente estudiados debido a su papel protector contra enfermedades cardiovasculares y de cáncer (MacDonald *et al.*, 2005; Ellington *et al.*, 2006).

2.1.4 Compuestos antinutricios

Los compuestos antinutricios son aquellos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, ya que dificultan e inhiben la asimilación de nutrientes que provienen generalmente de alimentos de origen vegetal; estos factores son de naturaleza variada y pueden llegar a ser tóxicos o causar efectos fisiológicos poco deseables (Elizalde *et al.*, 2009).

El frijol común presenta compuestos antinutricios tales como los inhibidores de tripsina, inhibidores de α -amilasa, rafinosa, fitohemaglutininas, cianógenos, antivitamina E y ácido fítico (FAO, 1995; Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). Los inhibidores de tripsina, así como otros factores anti-nutricios del frijol común, son

termosensibles; es por ello que se han desarrollado diferentes métodos tecnológicos para inactivarlos, como son la cocción tradicional, autoclave, extrusión, tostado y microondas (Carbonaro *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 2002).

2.2 Fracción no digerible

La fracción no digerible (FND) se define como la parte de los vegetales que no es digerida o absorbida en el intestino delgado y llega al colon, donde sirve como un sustrato para la microflora fermentativa (Saura-Calixto *et al.*, 2000). Se compone de fibra y otros compuestos resistentes a las acciones enzimáticas, tales como la proteína no digerible, el almidón resistente, polifenoles y otros compuestos bioactivos (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010).

La FND es una alternativa fisiológica al concepto común de fibra dietética (Saura-Calixto y Goñi, 2004) y las condiciones analíticas para su determinación son cercanas a las condiciones fisiológicas (pH, temperatura y tiempos de incubación). Se compone de dos fracciones: una fracción soluble (sobrenadante de la digestión enzimática) y una fracción insoluble (residuos de la digestión enzimática) (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

2.2.1 Fracción no digerible (FND) en frijol común

El frijol común presenta cantidades significativas de FND, alrededor del 44%, la cual se compone de fibra soluble e insoluble, almidón resistente, oligosacáridos, compuestos fenólicos, proteína y/o péptidos que pueden ser fermentados y liberados en el colon (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010). Se sabe que la FND ejerce un efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon en modelos *in vivo* e *in vitro*, esto a través de eventos celulares relacionados con apoptosis y progresión del ciclo celular (Campos-Vega *et al.*, 2012; Vergara-Castañeda *et al.*, 2012). Estos efectos se han atribuido a la acción de los productos de la fermentación de carbohidratos en combinación con polifenoles presentes en la FND.

Vergara-Castañeda *et al.* (2010) reportan la composición de la FND de frijol común cultivar Bayo Madero (Cuadro 5) así como el contenido en la FND de

oligosacáridos (15.8 mg/g de muestra seca), fenoles totales (13.8 mg eq ácido gálico/g muestra seca) y taninos condensados (14.0 mg eq (+)-catequina/g de muestra seca). También mencionan que la FND de este cultivar tiene significativas cantidades de oligosacáridos, almidón resistente, fenoles totales y taninos condensados, compuestos que están relacionados con un menor riesgo para desarrollar cáncer de colon.

Luna Vital *et al.* (2014) reportaron valores del contenido de la FND de frijol común entre 41.3-46.6%. La FND se componía de proteína, cenizas, carbohidratos y lípidos, que tuvieron intervalos de 16.3-20.16%, 2.2-3.2%, 73.5-78.8% y 0.9-2.1%, respectivamente.

Cuadro 5. Composición química de la FND del frijol común cultivar Bayo Madero

| Compuesto | FND (%) |
|--------------------|---------|
| Proteína | 17.1 |
| Lípidos | 2.2 |
| Cenizas | 2.3 |
| Fibra total | 51.7 |
| Fibra insoluble | 51.1 |
| Fibra soluble | 0.6 |
| Almidón resistente | 25.5 |

FND: Fracción no digerible. Los resultados se expresan como porcentaje por gramo de muestra seca. Adaptada de Vergara-Castañeda *et al.* (2010).

2.3 Digestión y absorción de compuestos fenólicos

2.3.1 Digestión

Los polifenoles se encuentran en los alimentos principalmente como ésteres, glicósidos y polímeros; los cuales no pueden absorberse en sus formas nativas, por lo tanto, requieren de hidrólisis por enzimas del sistema digestivo o de la microflora intestinal. Se estima que 48% de polifenoles son digeridos en el intestino delgado y 42% en el intestino grueso; solamente el 10% no son digeridos y permanecen intactos en la matriz alimentaria (Saura-Calixto *et al.*, 2007). De todos los polifenoles, las agliconas son capaces de pasar a través de las membranas biológicas ya que son altamente lipofílicas. La biodisponibilidad de los

polifenoles también depende de la matriz alimentaria; ya que pueden reaccionar con algunos constituyentes de los alimentos, como proteínas y carbohidratos que pueden afectar significativamente la forma de absorción. Otros factores importantes son el pH y la presencia de sales biliares en el ambiente intestinal (Manach *et al.*, 2004).

La hidrólisis de glucósidos de flavonoides comienza en la boca, por acción de la β -glucosidasa, no obstante, su efectividad depende del tipo de azúcar presente en la molécula. Los conjugados de glucosa son rápidamente hidrolizados a diferencia de otros, como los de ramnosa (Grajek, 2007).

En el estómago los oligómeros de flavonoides se degradan a unidades más pequeñas, debido al bajo pH. De todos los flavonoides, los flavon-3-oles se encuentran como agliconas y pasan intactos en el duodeno. La desglicosilación, glucoronidación, metilación, sulfonación e hidroxilación de los flavonoides ocurre en el intestino delgado. Como el flavonoide galato de epigallocatequina (EGCC), que en condiciones de alto pH puede ser oxidado a formas potentes para eliminar los radicales libres y quelar iones de hierro (Steer *et al.*, 2003). Además, ocurre la absorción de ácidos fenólicos, los cuales se conjugan con ácido glucurónico. Los ésteres de los ácidos fenólicos son degradados por esterasas presentes en el intestino grueso (Scalbert *et al.*, 2002).

Los polifenoles no digeridos en el intestino delgado pasan al intestino grueso, donde son sometidos a una mayor degradación en ácidos fenólicos por la microbiota, como se ha demostrado en varios estudios (Déprez *et al.*, 2000; Rechner *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Saura-Calixto *et al.*, 2007):

- Los glucósidos son hidrolizados por bacterias a agliconas, las cuales son transformadas en varios ácidos por la acción de las β -glucosidasa, β -ramnosidasa y esterasas. A diferencia de las enzimas nativas, las de la microflora pueden catalizar la degradación de cadenas de flavonoides a unidades simples y también pueden realizar hidrólisis, dehidroxilación,

desmetilación y descarboxilación. Así que, dependiendo de la estructura de los polifenoles, se puede producir una gran variedad de sustancias.

- Los flavonoles dan lugar a ácidos hidroxifenilacéticos, mientras que las flavonas y flavononas son degradadas a ácidos hidroxipenilpropiónicos, Los flavanoles se degradan tanto a ácidos fenilvalerolactenos como a hidroxifenilpropiónicos.
- Los metabolitos de todos estos compuestos son etapas que conducen en última instancia al ácido benzoico, su presencia se debe a la acción de la microbiota y pueden absorberse en la circulación, donde se unen a albúmina y son transportados al hígado. Allí se someten a hidroxilación, desmetilación, o-metilación; así como la conjugación con glucurónidos y derivados sulfatados a través de enzimas de fase I y II. Una parte significativa de estos pueden, en etapas posteriores, ser secretados de nuevo junto con las sales biliares en el intestino, donde otra vez son sometidos a hidrólisis para ser absorbidos de nuevo o excretados por las heces.
- El metabolismo de las antocianinas en el intestino grueso consiste en la escisión de los enlaces glucósidicos y ruptura de la cadena heterocíclica de antocianina (Aura *et al.*, 2005). Mientras que, el metabolismo de lignanos de linaza procede a través de la acción de la microflora, formando productos de enterolactona y enterodiol.
- La hidrólisis de una isoflavona (como daidzeina) conduce a la producción de equol, que demuestra alta afinidad por el receptor de estrógeno. La conjugación de isoflavonas con glucuronide y derivados sulfatados, también ocurre en el hígado por las enzimas UDP-glucuronositransferasa y sulfotransferasa, respectivamente. También se asume que los flavonoides pueden ser metabolizados, sin la ayuda de bacterias intestinales, a través de la acción de la florizina hidrolasa (glicosilceramidasa), una enzima del borde en cepillo del intestino delgado (Williamson *et al.*, 2000).

2.3.2 Absorción

Dependiendo del grado de complejidad estructural y polimerización, los compuestos fenólicos pueden ser absorbidos en el intestino delgado (polifenoles de bajo peso molecular tales como estructuras monoméricas y diméricas) (Appeldoorn *et al.*, 2009a) o llegar al colon casi sin alteraciones (polifenoles oligoméricos y poliméricos tales como taninos condensados o hidrolizables, de pesos moleculares cerca a los 40 000 Da) (Walle, 2004; Manach *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2005; Bosscher *et al.*, 2009; Monagas *et al.*, 2010).

Se ha estimado que sólo del 5-10% de la ingesta total de polifenoles es absorbida en el intestino delgado, generalmente después de las reacciones de desconjugación tales como desglucosilación (Manach *et al.*, 2005). Los polifenoles restantes (90-95% de la ingesta total) pueden acumularse en el lumen del intestino grueso hasta el intervalo milimolar donde, junto con los conjugados, se excretan en el lumen intestinal a través de la bilis, siendo sujetos a actividades enzimáticas de la flora intestinal (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Appeldoorn *et al.*, 2009b; Jacobs *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2009; Urpi-Sarda *et al.*, 2009; Larrosa *et al.*, 2010; Stoupi *et al.*, 2010; Kutschera *et al.*, 2011). Por lo tanto, la microbiota colónica es responsable de la extensa ruptura de las estructuras fenólicas originales en una serie de metabolitos fenólicos de pesos moleculares bajos que, al ser absorbidos en el colon, pueden llegar a ser responsables de efectos en la salud derivados del consumo de alimentos ricos en polifenoles, en lugar de los compuestos originales que se encuentran en los alimentos.

2.3.3 Microbiota

Actualmente, se estiman que 500-1000 diferentes especies microbianas habitan el tracto gastrointestinal, llegando a la más alta concentración en el colon (hasta 10^{12} células por gramo de excremento). Sin embargo, solamente pocas especies bacterianas que catalizan el metabolismo de los polifenoles han sido identificadas, junto con las vías catabólicas implicadas (Kutschera *et al.*, 2011). *Clostridium* y *Eubacterium* son los principales géneros involucrados en el metabolismo de muchos compuestos fenólicos tales como isoflavonas (daidzeina), flavonoles

(quercetina y kaempferol), flavonas (naringina) y flavan-3-oles (catequina y epicatequina) (Selma *et al.*, 2009).

Consecuentemente, además de la variación interindividual en la ingestión de polifenoles, las diferencias interindividuales en la composición de la microbiota intestinal pueden llevar a diferencias en la biodisponibilidad y bioeficacia de los polifenoles y sus metabolitos (Cerdá *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2010). Algunos estudios han sugerido que los sustratos fenólicos suministrados a las bacterias intestinales a través de diferentes patrones/diseños de ingesta dietaria y los metabolitos aromáticos producidos, pueden modular y causar fluctuaciones en la composición de la población de la microflora a través de efectos prebióticos selectivos y actividades antimicrobianas contra bacterias patógenas intestinales (Lee *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Selma *et al.*, 2009; Laparra and Sanz, 2010; G. Mandalari *et al.*, 2010; Giuseppina Mandalari *et al.*, 2010; Hervert-Hernández y Goñi, 2011; Tzounis *et al.*, 2011; Queipo-Ortuño *et al.*, 2012).

Tanto la formación de metabolitos bioactivos derivados de polifenoles y la modulación de la microbiota colónica pueden contribuir a la salud del huésped, aunque no han sido trazados los mecanismos. Las propiedades atribuidas a la salud por bacterias benéficas para el huésped humano incluyen protección contra desórdenes y patógenos intestinales, procesamiento de nutrientes, reducción del colesterol en el suero, refuerzo de las uniones de células epiteliales del intestino, aumento de la secreción de mucosa y modulación de la respuesta inmune intestinal a través de estímulo de las citoquinas (Duggan *et al.*, 2002; Gotteland *et al.*, 2008; Vitali *et al.*, 2010).

2.3.4 Productos de la fermentación de compuestos fenólicos

Dentro de los polifenoles, los oligómeros y polímeros de flavan-3-oles, también llamados proantocianidinas, no son absorbidos o degradados en monómeros durante su tránsito a través del estómago (Arts y Hollman, 2005; Manach *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando llegan al colon son metabolizados por la microbiota intestinal en varios ácido fenólicos incluyendo fenilpropiónico, fenilacético y

derivados de ácido benzoico (Déprez *et al.*, 2000). Los ésteres de ácido hidroxicinámico y los polifenoles unidos a ramnosa también son degradados a ácidos fenólicos por la microbiota (Manach *et al.*, 2005).

2.3.4.1 Actividad biológica de los productos de fermentación de los compuestos fenólicos

Estudios han reportado que los metabolitos de los compuestos fenólicos derivados de la microbiota del colon pueden ejercer varias actividades biológicas, tales como capacidad antioxidante (Glässer *et al.*, 2002), inhibición de la agregación plaquetaria (Rechner y Kroner, 2005), inhibición de la ciclo-oxigenasa-2 en células de cáncer de colon HT-29 (Karlsson *et al.*, 2005), reducción en la síntesis de prostanoïdes en células de colon (Russell *et al.*, 2006), actividad antiproliferativa en células de próstata y cáncer (Gao *et al.*, 2006), entre otras.

2.3.4.1.1 Actividad antiinflamatoria de ácidos fenólicos

Una relación entre la estructura y actividad se observó entre los ácidos fenólicos y sus efectos antiinflamatorios, ya que sólo los ácidos fenólicos dihidroxilados (por ejemplo: ácidos 3,4-dihidroxifenilpropiónico y 3,4-dihidroxifenilacético) inhibieron significativamente la producción de las citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), y las interleucinas (IL- β e IL-6) en células mononucleares de sangre periférica (PBMN) estimuladas con LPS, mientras que no hubo efecto significativo para los ácidos monohidroxilados (Monagas *et al.*, 2009). De forma similar Larrosa *et al.*, (2009), informaron que los ácidos fenólicos dihidroxilados proveen la mejor inhibición de la producción de prostaglandina E2 en células de cáncer de fibroblastos (CCD-18) estimuladas con IL- β . Experimentos *in vivo* con ratas también han mostrado que el ácido 3,4-dihidroxipropionico reduce la expresión de citoquinas TNF- α , IL- β , IL-8, así como malonaldehído y daño oxidativo a DNA en la mucosa distal de ratas con colitis inducida mediante dextrano-sulfato de sodio (DSS) (Larrosa *et al.*, 2009).

2.4 Inflamación y sistema inmune

El sistema inmunitario innato está compuesto por barreras epiteliales, células circulantes y tisulares y proteínas plasmáticas. Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los neutrófilos, los fagocitos mononucleares y los linfocitos citolíticos naturales (células NK, por sus siglas en inglés). Su misión consiste en atacar a los microbios después de haber abierto una brecha en las barreras epiteliales y haber penetrado en los tejidos o en la circulación. Cada uno de estos tipos celulares ocupa un lugar distinto en la respuesta a su entrada. Parte de las células encargadas de la inmunidad innata, en especial los macrófagos y los linfocitos NK, segregan citocinas que activan los fagocitos y estimulan la reacción celular de este proceso, llamada inflamación (Abbas *et al.*, 2012).

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. La inflamación es una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria o, incluso, cáncer (Medzhitov, 2008; Weiss, 2008). Para reducir la inflamación se usan medicamentos que sean eficientes anti-TNF; anti-IL-6, anti-IL-1, e inhibidores de NF- κ B (Terzić *et al.*, 2010).

2.4.1 Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas mononucleares pleiotrópicas involucradas en un gran número de funciones dentro del sistema inmune. Son efectores de la respuesta innata y están muy relacionadas, tanto en el inicio, como en las fases posteriores de la respuesta adaptativa. Además, son importantes en el mantenimiento de la homeostasis (eliminación de células apoptóticas, reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos, etc.) (Mantovani *et al.*, 2002).

Los macrófagos están presentes en todos los tejidos del cuerpo y se activan mediante un estímulo, produciéndose, entre otras cosas, la síntesis de citoquinas

proinflamatorias (Plowden *et al.*, 2004). En ausencia de estímulos, los macrófagos mueren por apoptosis, como balance de producción y eliminación de células efectoras (Celada y Nathan, 1994).

La fagocitosis constituye la primera línea de defensa contra partículas extrañas que han superado la barrera epitelial. Los macrófagos son capaces de fagocitar macromoléculas, como antígenos, microorganismos e incluso células propias dañadas o muertas. Los macrófagos reconocen estos patógenos a través de sus receptores de superficie, los cuales discriminan entre moléculas de superficie mostradas por patógenos o por el propio hospedador (Aderem y Underhill, 1999). Los macrófagos además de fagocitar, también producen una gran variedad de productos tóxicos que ayudan a matar al microorganismo fagocitado. Los más importantes son óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O_2^-), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son tóxicos para bacterias y otros microorganismos. El óxido nítrico es producido principalmente por la forma inducible de la NO sintasa (iNOS) (Janeway *et al.*, 2001).

Cuando los macrófagos están activados, pueden dañar los tejidos normales del huésped debido a la liberación de enzimas lisosómicas, especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO). Los productos microbicidas de estas células no distinguen entre los tejidos propios y los microbios. Por consiguiente, si penetran en el medio extracelular, son capaces de provocar una lesión tisular (Abbas *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Activación de macrófagos

En los tejidos, los monocitos se diferencian a macrófagos residentes con un fenotipo determinado que depende del microambiente tisular, matriz extracelular y moléculas de superficie de las células adyacentes y de sus productos de secreción. Esta cualidad de expresar rangos de fenotipos morfológicos y funcionales muy amplios contribuye a la gran heterogeneidad de los mismos (Gordon, 2003; Gordon y Taylor, 2005).

La activación de los macrófagos comprende alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que confieren al macrófago activado la capacidad de realizar alguna función que no puede realizar el monocito en reposo, como matar microorganismos, lisar células tumorales, secretar mediadores inflamatorios, actuar como células presentadoras de antígenos más eficaces, etc. En general, la activación del macrófago es el resultado de una nueva transcripción génica o de un aumento de la misma (Mantovani *et al.*, 2007; Puig-Kröger *et al.*, 2009). Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son los lipopolisacáridos (LPS) y la citoquina INF- γ , aunque también hay otros agentes como el GM-CSF, MCSF, IL-1, IL-2, IL-4 y el TNF- α que pueden inducir algunos cambios en la activación (Celada y Nathan, 1994).

La activación clásica de los macrófagos (CAMs) es inducida por citoquinas proinflamatorias tipo I (IFN- γ , TNF- α), por el M-CSF, o tras el reconocimiento de los PAMPs (patrones moleculares asociados al patógeno: LPS, lipoproteínas) y señales de peligro endógenas. Estas células ejercen funciones, anti-proliferativas y citotóxicas, secretando especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (NO, peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, superóxido), citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6) (Stuehr y Nathan, 1989; Mytar *et al.*, 1999).

El LPS bacteriano (o endotoxina) es un producto de las bacterias gramnegativas, y es un potente estimulador de las respuestas inmunitarias innatas. El LPS está presente en las paredes celulares externas de las bacterias gramnegativas y contiene tanto componentes lipídicos como moléculas de polisacáridos. El LPS es un potente activador de los macrófagos. El LPS se une a una proteína plasmática de unión al LPS (LBP), y el complejo después se une a CD40 en los macrófagos. La porción de LPS es reconocida entonces por el RTT4. Los macrófagos, que sintetizan y expresan CD14, pueden responder a cantidades muy pequeñas de LPS, de tan sólo 10 pg/mL, y las células que carecen de CD14 no responden en general al LPS. Los genes que son inducidos por el LPS codifican citocinas, coestimuladores y enzimas del estallido respiratorio (Abbas *et al.*, 2012).

2.4.1.2 Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

Esta línea celular deriva de la línea celular monocito/macrófago RAW 264.7 obtenida por el Dr. Peter Ralph (Ralph y Nakoinz, 1977), y se diferencia de esta última en que necesita la presencia de lipopolisacárido (LPS) para producir óxido nítrico (NO), ya que el tratamiento con IFN- γ (Interferón gamma o tipo II) no es suficiente. Las células RAW 264.7 producen una cantidad de nitritos (metabolito estable de la reacción del NO con el oxígeno) (Moncada *et al.*, 1991).

Cuando los macrófagos son activados expresan transcripcionalmente la isoenzima inducible iNOS, la cual es responsable de la prolongada producción de NO (Ding *et al.*, 1988; Nathan y Xie, 1994). La generación fisiológica o normal de NO media las acciones bactericidas y tumoricidas de los macrófagos; sin embargo, cuando existe una liberación aberrante de NO, se lleva a cabo el incremento de la inflamación, así como el daño al tejido (Thiemermann y Vane, 1990; Evans, 1995). Por tanto, la inhibición de la producción de NO es un blanco terapéutico importante en el desarrollo de agentes antiinflamatorios (Tsao *et al.*, 2002).

El modelo celular de macrófagos murino RAW 264.7 estimulado con LPS induce la transcripción y transducción de iNOS con la subsecuente producción de NO (MacMicking *et al.*, 1997). Por tanto, las células RAW 264.7 son un excelente modelo para la evaluación de compuestos que inhiban la inducción de iNOS y producción de NO (Yoon *et al.*, 2009).

Ruangnoo *et al.* (2012) y Joo *et al.* (2014) trabajaron con células RAW 264.7 estimuladas con LPS, para demostrar que extractos de plantas que contenían compuestos fenólicos inhiben la producción de NO. Indicando con ello, que metabolitos secundarios de plantas actúan como excelentes agentes antiinflamatorios y juegan un importante papel en el estrés oxidativo e inflamación (Sheu *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

El frijol común (*P. vulgaris* L.) presenta una gran variedad de compuestos fenólicos (CF), que incluyen flavonoides (antocianinas, flavonoles y proantocianidinas) y ácidos fenólicos (ácido gálico, cumárico, etc.); con actividad biológica tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, el potencial bioactivo de los CF del frijol común se ha evaluado a partir de extractos, sin tomar en cuenta el proceso de digestión en boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso, lo que sin duda afecta el perfil de CF y su bioaccesibilidad.

La fracción no digerible (FND) del frijol común presenta cantidades importantes de CF, los cuales no se han caracterizado ni se les ha dado un seguimiento en la fermentación colónica. Se ha reportado que alrededor del 90% del total de CF de la dieta escapan la degradación por enzimas intestinales, llegando al colon para ser fermentados o liberados por la microbiota asociada.

Algunos de los productos de fermentación colónica (PF) de los CF son los derivados de los ácidos hidroxifenilacético e hidroxifenilpropiónico, los cuales se han estudiado a partir de otros sustratos y se ha informado que presentan diversas actividades biológicas entre ellas la antiinflamatoria.

Es por ello, que la propuesta para este trabajo fue dar un seguimiento a los CF durante la digestión enzimática y fermentación colónica *in vitro*, caracterizando en cada etapa de la digestión a los CF y evaluando la capacidad antioxidante de toda la matriz del frijol común cocido (*P. vulgaris*, variedad Bayo Madero), así como la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los PF sobre macrófagos murino, usando como marcador la producción de óxido nítrico (NO).

IV. OBJETIVOS

4 Objetivo general

Caracterizar el perfil de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cocido y evaluar su actividad antiinflamatoria *in vitro*.

4.1 Objetivos particulares

4.1.1 Caracterizar y cuantificar los compuestos fenólicos del frijol común cocido durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

4.1.2 Evaluar la capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

4.1.3 Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto de fermentación colónica *in vitro* en el modelo de macrófagos murinos.

4.1.3.1 Viabilidad celular

4.1.3.2 Producción de óxido nítrico

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Compuestos químicos

Los reactivos y solventes fueron adquiridos de la marca J. T. Baker. El medio de cultivo McCoy's 5A se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EU). El suero fetal bovino (SFB), los antibióticos y antimicóticos fueron de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, NY). La pancreatina, pepsina y bilis bovina fueron obtenidas de Sigma (Sigma-Aldrich, Canada Ltd).

5.1.2 Materia prima

Se utilizó la variedad de frijol común (*P. vulgaris*) Bayo Madero cosecha 2013; el cual fue donado por el Instituto Nacional de Investigadores, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental del Bajío.

5.1.3 Material biológico

Se utilizaron 12 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con pesos entre 250 y 300 g, las cuales fueron adquiridas del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla. La línea celular de macrófagos murino Raw 264.7, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EU).

5.2 Métodos

5.2.1 Tratamiento térmico del frijol común

Las semillas secas de frijol común fueron cocidas de acuerdo al método de Aparicio-Fernández *et al.* (2005a). Brevemente, el frijol se colocó en un recipiente con agua grado HPLC (1:5 p/v) y se calentó durante 2.5 h. Las semillas cocidas con el caldo fueron liofilizadas, molidas en un molino casero (Osterizer, México) y pasadas a través de una malla número 20 (0.84 mm). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

5.2.2 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Se simuló el proceso digestivo del frijol común Bayo Madero cocido, desde la boca hasta su fermentación en el colón, usando el modelo de Campos-Vega *et al.* (2015). La simulación que se llevó a cabo fue *in vitro*, con diferentes enzimas (α -amilasa salival proveniente de la boca de personas sanas; pepsina y pancreatina de origen porcino, y hiel de buey, los cuales fueron adquiridas en Sigma).

5.2.2.1 Simulación de las condiciones de la boca

En este paso se siguió la técnica descrita por Granfeldt *et al.* (1992), con ligeras modificaciones como se describe a continuación: se reunieron 5 voluntarios sanos, a quienes se les explicó el procedimiento a seguir. Los sujetos consumieron su último alimento al menos 90 min antes de comenzar el ensayo. Antes de masticar la muestra se les pidió enjuagarse la boca con agua.

Los 5 voluntarios masticaron 1 g de muestra (frijol cocido) 15 veces, durante 15 segundos, descargando el contenido en un recipiente con 5 mL de agua destilada. Inmediatamente después, cada sujeto se enjuagó por 60 s con otros 5 mL de agua destilada, depositando el líquido en el vaso anterior. Posteriormente se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un solo vaso, para proceder a la digestión del estómago. Por otro lado, también se preparó un blanco en el cual sólo se utilizó agua destilada en lugar de muestra y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

De cada muestra se tomó una alícuota (1 mL) para cuantificar los compuestos fenólicos y determinar la capacidad antioxidante.

5.2.2.2 Simulación de las condiciones del estómago

Se siguió la metodología descrita por Stein *et al.* (2011). Se tomaron 10 mL de la suspensión anterior, se ajustó el pH a 2 con HCl 2 N. A cada muestra se añadió la pepsina (0.055 g), disuelta en 0.94 mL de HCl 20 mM. Con esta mezcla se simuló los fluidos gástricos, que se incubaron con agitación constante por 2 h a 37 °C.

Después de la incubación se tomó una alícuota (1 mL) de cada muestra para cuantificar los compuestos fenólicos y determinar la capacidad antioxidante.

5.2.2.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Las soluciones de este paso se realizaron de acuerdo a lo sugerido por Ma *et al.*, (2012), con algunas modificaciones. Se preparó un extracto intestinal sintético diluyendo 3 mg de hiel de Buey (Sigma) y 2.6 mg de pancreatina (sigma) en 5 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer [conteniendo 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl₂, pH 6.8 (preparar 30 min antes de utilizarse)]. Se agregaron 5 mL de del extracto intestinal a cada muestra y al blanco; la suspensión se transfirió a un recipiente que contenía el saco intestinal invertido, se ajustó el pH entre 7.2 y 7.4 con NaOH 2M y se incubó con agitación constante por 2 h a 37 °C.

5.2.2.3.1 Técnica del saco intestinal invertido utilizando ratas.

El saco se preparó siguiendo la metodología descrita por Patil *et al.* (2010).

5.2.2.3.1.1 Manejo de los animales

Para llevar a cabo esta técnica se emplearon 12 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley) con un peso entre 250 y 300 g, clínicamente sanas. Las ratas presentaron un ayuno de alimento de 16 h, ya que la técnica de saco invertido así lo requería.

5.2.2.3.1.2 Sacrificio de animales y preparación del saco intestinal invertido

Para el sacrificio de las ratas, estas se anestesiaron en una cámara de éter etílico, se utilizó únicamente el intestino; el cual fue expuesto por una incisión abdominal en la línea media. Un segmento de 20-25 cm del yeyuno proximal de cada rata se escindió y colocó inmediatamente en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificada con CO₂ a 37 °C, esto para mantener la viabilidad del intestino. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución amortiguadora para retirar residuos y se cortó en segmentos más pequeños de longitud aproximada de 6 cm. Estos últimos se voltearon suavemente y se ligaron de un extremo (este

procedimiento se realizó con los segmentos de intestino sumergidos en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido). Cada segmento se llenó con 1 mL de la solución amortiguadora de Krebs-Ringer (lado basolateral, BL) y posteriormente se ligó el otro extremo del intestino para crear un saco, el cual fue inmediatamente incubado en un baño conteniendo los 15 mL de la suspensión anterior (procedente de la simulación del estómago), a 37 °C por 2 h, en agitación continua y en atmósfera anaerobia (CO₂) (Campos-Vega *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012). Lo mencionado anteriormente permitió la simulación *ex situ* del intestino delgado.

Después del periodo de incubación se retiraron los sacos, la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal) se denominó fracción no digerible (FND) (lado apical, AP), la cual posteriormente se sometió a una fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por triplicado. Una alícuota (1 mL) del sobrenadante de la FND se tomó para cuantificar los compuestos fenólicos y determinar la capacidad antioxidante.

5.2.2.3.1.3 Manejo de los animales después del sacrificio

Debido a que el interés para este estudio sólo fue el intestino de los animales, los restos de las ratas no requeridos se destinaron a desecho, se almacenaron en una bolsa grande color amarillo en un congelador (-20 °C), la bolsa se marcó con la leyenda “desechos biológicos”, y se almacenaron por un periodo máximo de 15 días hasta su debido transporte e incineración (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

El material quirúrgico utilizado se remojó con cloro por 12 h, después se lavó y esterilizó para su posterior almacenamiento.

5.2.2.4 Fermentación *in vitro* de la FND

El método de fermentación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Campos-Vega *et al.* (2009). Las fermentaciones se realizaron en dos experimentos independientes, en donde se empleó el clorogénico (50 mg) como control positivo de compuesto fenólicos fermentable y la rafinosa (100 mg) como carbohidrato fermentable, esto bajo las mismas condiciones. El inóculo fecal humano se empleó

como fuente de flora bacteriana representativa del colon, el cual se obtuvo de dos individuos voluntarios sanos en su primera evacuación del día, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra.

Tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal contenían (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, bicarbonato de sodio 2.0, clorhidrato de cisteína 0.5, sales biliares 0.05, Tween-80 2 mL, vitamina K1 10 µL y hematina 0.05 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Los tubos se sellaron y mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 30 min. El inóculo fecal (3 g de materia fresca, 1.5 g por cada individuo) se homogeneizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Los tubos con el medio de cultivo basal se inocularon con 1 mL de homogeneizado fecal, posterior a la inoculación se les adicionó 0.5 g de la FND insoluble y 0.5 mL de la FND soluble de la muestra de frijol; con excepción del control negativo, al cual se le adicionó 1 mL del blanco de la FND. Los tubos se agitaron con vortex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37 °C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h). Durante la fermentación, el pH, los compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y la producción de hidroxifenil ácidos se determinó a las 0, 2, 6, 12 y 24 h.

La fermentación se detuvo centrifugando para separar los sólidos del líquido, posterior a esto se congelaron las muestras y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

5.2.3 Composición química

Los análisis proximales se aplicaron a la materia prima, así como a la fracción no digerible de la misma. El contenido nutricional se cuantificó de acuerdo a los métodos de la AOAC (2002), como se observa en el Cuadro 6.

La cantidad de carbohidratos totales se determinaron por la diferencia obtenida del 100% menos la suma del porcentaje de cenizas, proteína, grasa y humedad.

Cuadro 6. Métodos de la AOAC utilizados para la cuantificación de los nutrientes

| Compuesto | Método |
|-----------|--------|
| Cenizas | 923.03 |
| Proteína | 984.13 |
| Lípidos | 920.39 |
| Humedad | 925.10 |

AOAC, 2002

5.2.4 Potencial nutracéutico

El potencial nutracéutico incluyó la determinación de compuestos fenólicos y la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico del frijol cocido liofilizado (FCL); de los extractos de la digestión *in vitro* (en boca, estómago, dentro de intestino delgado/lo absorbido (DID) y fracción no digerible (FND)); así como de los extractos de la fermentación colónica. Cabe señalar que cada extracto se analizó con su blanco correspondiente.

5.2.4.1 Determinación de compuestos fenólicos

5.2.4.1.1 Extracción metanólica

La extracción de compuestos fenólicos del frijol cocido liofilizado (FCL) se llevó a cabo el método descrito por Cardador-Martínez *et al.* (2002a). Brevemente, se adicionaron 10 mL de metanol a un 1 g de FCL en un matraz protegido de la luz, y se mantuvo en agitación constante durante 24 h. Al finalizar la extracción, la suspensión se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se utilizó para analizar compuestos fenólicos.

5.2.4.1.2 Fenoles totales (Folin-Cicalteau)

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo al procedimiento de Folin-Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999). Se mezclaron 50 μL del extracto correspondiente con 200 μL de agua. Se añadieron 125 μL el reactivo de Folin-Ciocalteau 1 N, y se neutralizó la reacción de oxidación con 625 μL de carbonato de sodio 7%. Posteriormente, se mantuvo en reposo durante 2 horas en un frasco protegido de la luz. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices).

Los cálculos de fenoles totales se realizaron mediante una curva de calibración con ácido gálico, expresando los resultados como μg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca (μg EAG/g muestra seca).

5.2.4.1.3 Flavonoides totales

Los flavonoides se midieron siguiendo el método de Oomah *et al.* (2005), este consistió en colocar 50 μL del extracto correspondiente en una microplaca de 96 pozos, después se agregaron 180 μL de metanol y finalmente 20 μL de una solución de 2-aminoetil-difenilborato al 1% en metanol. Una vez realizada la mezcla se midió la absorbancia a 404 nm en un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices).

Se utilizó una curva de calibración con rutina para realizar los cálculos correspondientes, expresando los resultados como μg de equivalentes de rutina/g de muestra seca (μg ER/g muestra seca).

5.2.4.1.4 Taninos condensados

Para la cuantificación de taninos condensados se utilizó la prueba de vainillina de Deshpande y Cheryan (1985, 1987). Se colocaron 50 μL del extracto correspondiente en una microplaca de 96 pozos y se le adicionaron 200 μL de una mezcla de vainillina 1%- HCl 8% (recién preparada). Se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). A lo

largo del análisis también se colocaron 50 µL del blanco correspondiente con 200 µL de HCl 4%.

La concentración de taninos condensados se calculó a partir de una curva de calibración realizada con (+)-catequina. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de (+)-catequina/g de muestra seca (mg ECAT/g muestra seca).

5.2.4.1.5 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en HPLC

El análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD se realizó de acuerdo al procedimiento de Ramírez-Jiménez *et al.* (2014). Se analizaron las muestras y blancos provenientes de la extracción metanólica del frijol cocido liofilizado (FCL), del sobrenadante de boca, del estómago, de dentro del intestino delgado, de la FND soluble y de los extractos de fermentación colónica *in vitro*. El análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD) se llevó a cabo en un sistema de HPLC serie Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 µm). La columna se controló con termostato a 35 °C ± 0.6 y la velocidad de flujo fue de a 1 mL/min. La fase móvil consistió de dos solventes: el solvente A fue agua ajustada con 1% de ácido acético y el solvente B fue acetonitrilo. Se usó un gradiente lineal como sigue: 80-83% de solvente A por 7 min, 83-60% por 5 minutos, 60-50% por 1 min y 50-85% por 2 min, terminando la corrida a los 16 min. Entre las inyecciones se dejó que la columna se equilibrara por 16 min. La detección se realizó a 280 y 320 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. Un volumen de 50 µL se inyectó y las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo usando método estándar externo con estándares comerciales de (+)-catequina, los ácidos caféico, clorogénico *p*-cumárico, ferúlico y gálico. Los resultados se expresaron en µg del estándar correspondiente/g muestra seca.

5.2.4.2 Identificación y cuantificación de metabolitos de compuestos fenólicos en HPLC

El análisis de los metabolitos de compuestos fenólicos en HPLC-DAD se realizó de acuerdo al procedimiento de Jakešević *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se analizaron las muestras y blancos provenientes de los extractos de fermentación colónica *in vitro*. El análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD) se llevó a cabo como se describió en el punto anterior. La columna se controló con termostato a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.6$ y la velocidad de flujo fue de 0.35 mL/min . La fase móvil consistió de dos solventes. El solvente A fue agua ajustada con 2% de ácido acético y el solvente B fue acetonitrilo ajustado con 2% de ácido acético. Se usó un gradiente lineal como sigue: 0-5 min 0% de solvente B, 5-44 min 0-25% B, 44-47 min 25-60% B, 47-56 min 60% B, 56-58 min 60-100%. Entre las inyecciones se dejó que la columna se equilibrara por 7 min. La detección se realizó a 280 nm con una velocidad de adquisición de 1 s. Un volumen de 50 μL se inyectó y las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo usando método estándar externo con estándares comerciales de los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxihipocinámico. Los resultados se expresaron en μg del estándar/g muestra seca).

5.2.4.3 Evaluación de capacidad antioxidante

5.2.4.3.1 ABTS

Para la aplicación del método de 2,2-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) se utilizó la técnica de Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. La generación del radical se realizó mezclando 88 μL de una solución de persulfato de potasio $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 140 mM con 5 mL de una solución acuosa de ABTS 7mM, y se mantuvo en un lugar oscuro durante 12 h. Finalizado el tiempo, se tomaron 500 μL de la solución anterior y se le agregaron de 20 a 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH=7.4). Midiéndose la absorbancia del radical a 734 nm, que debe encontrarse entre 0.7 y 1.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante en las muestras, se adicionaron 1900 µL del radical ABTS a 20 µL del extracto correspondiente. Se dejó reposar por 6 min y se leyó a 734 nm en un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices).

Se realizó una curva de calibración con el porcentaje de inhibición del radical a diferentes concentraciones de trolox y los resultados se expresaron como µmol de equivalentes de trolox/g de muestra (µmol TEAC/g de muestra). Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} * 100$$

5.2.4.3.2 FRAP

El ensayo de FRAP se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1996). Se preparó la solución FRAP, que contenía 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), FeCl₃ y solución amortiguadora de acetato. Se colocaron 25 µL del extracto correspondiente en cada pozo de la microplaca de 96 pozos y se adicionaron 175 µL de la solución de FRAP. En un espectrómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices) se leyó la absorbancia a 595 nm en los tiempos 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min, manteniendo la temperatura a 37 °C. La lectura a 90 min se seleccionó para calcular los valores de FRAP.

Para determinar el valor de FRAP de los extractos se utiliza la curva de calibración con FeSO₄. Los resultados se expresaron como µmol de FeSO₄/g muestra seca.

5.2.5 Ensayo biológico

Para evaluar la actividad antiinflamatoria en macrófagos murino, se usó como tratamiento el extracto de fermentación colónica *in vitro* de 12 h (EF 12h).

5.2.5.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), suplementado con 1% de

antibióticos-antimicóticos, 1% de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY). Cada tercer día el medio de cultivo se cambio por medio fresco, hasta alcanzar la confluencia. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C en una incubadora Thermo SCIENTIFIC 3100, y se manejan las células en una cámara de bioseguridad (NuAire).

5.2.5.2 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad se determinó con el ensayo del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las células Raw se sembraron en placas de 96 pozos (1 x 10⁴ células/pozo) en medio DMEM suplementado con 1% de antibióticos-antimicóticos, 1% de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino; el volumen total por pozo se ajustó a 200 µL. Se incubó 24 h a 37 °C en 5% CO₂. Después de este tiempo el medio fue sustituido por 200 µL de las diferentes concentraciones del tratamiento (0, 10, 20, 25, 30, 40, 50% de EF 12h) disueltas en medio DMEM (sin suero fetal bovino); a cada solución se le agregaron lipopolisacáridos (1 µg/mL) para activar los macrófagos. Como control positivo se utilizó la solución DMEM que sólo contenía lipopolisacáridos (1 µg/mL). Para este procedimiento se trabajo con la luz apagada, protegiendo reactivos y la placa de la luz; las soluciones fueron esterilizadas por filtración. Se dejó incubar en las condiciones antes mencionadas por 24 h.

También se realizó el ensayo de viabilidad sin la activación de los macrófagos, es decir no agregando lipopolisacáridos a las soluciones. En este caso el control fue la solución DMEM.

Después de dejar incubar por 24 h con las soluciones, se retiró el medio gastado y se añadieron 200 µL a cada pozo de una solución de MTT disuelto en DMEM (sin suero fetal bovino) con una concentración de 0.5 mg/mL. Después de incubar por 3 h a 37 °C, el medio fue desechado y los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO. La densidad óptica (DO) se determinó a 570 nm en un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{(\text{DO células tratadas})}{(\text{DO células control})} * 100$$

Las concentraciones que permitieron la viabilidad celular >80% se usaron para determinar la producción de NO (García-Lafuente *et al.*, 2014). Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

5.2.5.3 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO)

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos con 2×10^5 células/pozo y se dejó que se adhirieran por 24 h. Después, el medio fue desechado y reemplazado por medio fresco (DMEM, sin suero fetal bovino), conteniendo las diferentes concentraciones del tratamiento (0, 10, 20, 25, 30, 40, 50% de EF 12h), y agregando a cada solución los lipopolisacáridos (1 $\mu\text{g/mL}$) para llevar a cabo la activación de los macrófagos. Después de 24 h de incubación, se recolectaron 100 μL del medio de cultivo y con ayuda de una multicanal se pasaron a otra placa de 96 pozos, a los cuales se les agregaron 100 μL del reactivo de Griess (igual volumen de 1% de sulfamida disuelta en 5% de ácido fosfórico y 0.1% de N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato disuelta en agua; dejándose incubar a temperatura ambiente por 10 min en oscuridad. La absorbancia se leyó a 545 nm usando un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). La cantidad de nitrito presente en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración usando diferentes concentraciones de NaNO_2 (García-Lafuente *et al.*, 2014). Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

5.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar seguido de una comparación de medias por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Para los ensayos biológicos se usó la prueba de Dunnet. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico JMP 10.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Composición química

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del análisis proximal que se le realizó a la materia prima, es decir, al frijol cocido liofilizado, variedad Bayo Madero (BM) de la cosecha del 2013. Con fines comparativos, en el mismo cuadro se muestran los resultados reportados por Treviño-Mejía (2013), variedad BM de la cosecha del 2011.

Cuadro 7. Resultados del análisis proximal de la materia prima

| | Cenizas (%) | Proteínas (%) | Lípidos (%) | Carbohidratos (%) |
|-------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|
| FCL | 4.56 ± 0.02 | 20.65 ± 0.72 | 2.04 ± 0.13 | 72.75 ± 0.82 |
| FCL* | 4.69 ± 0.18 | 22.41 ± 0.16 | 1.64 ± 0.21 | 71.21 ± 0.36 |

Los resultados representan la media de tres experimentos independiente ± la desviación estándar. FCL= frijol cocido liofilizado, FCL*= frijol cocido liofilizado (Treviño, 2013).

En los valores mostrados en el Cuadro 7 se puede observar que existe una similitud entre los resultados obtenidos y los reportados por Treviño-Mejía (2013); donde la concentración tanto de carbohidratos, proteínas, lípidos como de cenizas del frijol común se encuentran dentro de los rangos que se han publicado (Paredes-Lopez *et al.*, 2006a; Hayat *et al.*, 2014). Se sabe bien que frijol común es una excelente fuente de proteínas, que contiene altos niveles de minerales y que su componente mayoritario son los carbohidratos. De ahí la importancia en que sea consumido como un alimento básico (Luthria y Pastor-Corrales, 2006).

6.2 Potencial nutracéutico

6.2.1 Compuestos fenólicos

6.2.1.1 Fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados

En el Cuadro 8 se presentan los resultados obtenidos del análisis de compuestos fenólicos mediante técnicas espectrofotométricas como lo son fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados.

Cuadro 8. Contenido de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

| TRATAMIENTO | Fenoles Totales (μg EAGAL/g muestra seca) | Flavonoides totales (μg ER/g muestra seca) | Taninos condensados (mg ECAT/g muestra seca) |
|-----------------|---|--|--|
| EM | 1205.95 \pm 10.33 ^d | 205.99 \pm 9.50 ^e | 18.17 \pm 0.14 ^a |
| Boca | 1211.74 \pm 10.37 ^d | 1400.06 \pm 62.55 ^{c,d} | 4.54 \pm 0.25 ^e |
| Estómago | 1208.97 \pm 22.05 ^d | 1525.11 \pm 64.12 ^c | 3.15 \pm 0.22 ^{e,f} |
| DID | 623.68 \pm 16.54 ^f | 891.44 \pm 31.36 ^d | ND |
| FND | 995.28 \pm 26.51 ^e | 1330.90 \pm 32.77 ^{c,d} | 2.48 \pm 0.13 ^f |
| EF | | | |
| 2 h | 2920.82 \pm 28.19 ^c | 2704.57 \pm 88.54 ^b | 9.83 \pm 0.33 ^d |
| 6 h | 6391.50 \pm 61.49 ^b | 4116.99 \pm 184.81 ^a | 15.00 \pm 0.56 ^{b,c} |
| 12 h | 6899.46 \pm 94.85 ^a | 4571.29 \pm 218.25 ^a | 15.89 \pm 0.36 ^b |
| 24 h | 6581.11 \pm 63.52 ^b | 3230.26 \pm 150.73 ^b | 13.90 \pm 0.29 ^c |

EM: extracto metanólico; DID: dentro de intestino delgado/absorbido; FND: fracción no digerible; EF: extracto de fermentación colónica; h: horas; EAGAL: Equivalentes de ácido gálico; ER: Equivalentes de rutina; ECAT: Equivalentes de (+)-catequina; ND: no detectado. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Extracto metanólico (EM)

Con respecto a la determinación de fenoles totales (Cuadro 8), el extracto metanólico (EM) del frijol común presentó una concentración de 1205.95 μg equivalentes de ác. gálico/g de muestra seca (μg EAGAL/g muestra seca), la cual se encuentra dentro de los valores reportados por Vergara-Castañeda *et al.* (2010) y Reyes-Martínez *et al.* (2014), quienes evaluaron la misma variedad de frijol común (BM), obteniendo valores de 1000 y 2613 μg EAGAL/g muestra seca, respectivamente.

En la determinación de flavonoides totales (Cuadro 8), la concentración que se encontró en el EM fue de 205.99 μg equivalentes de rutina/g de muestra seca (μg ER/g muestra seca), la cual es ligeramente menor a lo reportado por Reyes-Martínez *et al.* (2014) con 310 μg equivalentes de quercetina/g de muestra seca,

esto, comparando entre la misma variedad de frijol común. Cabe mencionar que la concentración obtenida de flavonoides totales en el EM se encuentra dentro de los valores reportados para diversas variedades de frijol común, que van desde 140 hasta 1800 μg equivalentes diferentes/g muestra seca (equivalentes tales como (+)-catequina, rutina y quercetina) (Oomah *et al.*, 2005; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Akillioglu y Karakaya, 2010; Reyes-Martínez *et al.*, 2014). Las antocianinas son parte de los flavonoides y son las responsables de dar color a la cubierta de frijol, de ahí que la variedad BM, al no ser una variedad oscura, presente valores bajos en flavonoides totales.

En cuanto a los taninos condensados en el EM (Cuadro 8), el contenido fue de 18.17 mg equivalentes de (+) catequina/g muestra seca (mg ECAT/g muestra seca), el cual se encuentra dentro de los rangos reportados para frijol común 7.4 - 21.04 mg ECAT/g muestra seca (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010).

Como se puede observar en los datos antes mencionados, los taninos condensados o proantocianidinas son el grupo de compuestos fenólicos más ampliamente distribuido en el frijol común, esto concuerda con lo reportado por González de Mejía *et al.* (2003). Además de que el frijol común variedad BM, al ser más bien una variedad clara, presenta valores de flavonoides más bajos y de taninos condensados más altos en comparación con variedades de frijol común que son negras, azules o rojas; esto concuerda con los estudios realizados por Espinosa-Alonso *et al.* (2006).

Fenoles totales y flavonoides durante digestión gastrointestinal *in vitro*

En la columna izquierda del Cuadro 9 se presentan las diferentes etapas de digestión y de fermentación colónica *in vitro* que se realizaron a la muestra de frijol común, y del lado derecho se muestran los resultados para cada etapa.

En el Cuadro 8 y en la Figura 7 se muestran los resultados de fenoles totales (FT) y flavonoides durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de la muestra. Se puede

observar que en ambas determinaciones la concentración de estos compuestos sigue una tendencia similar.

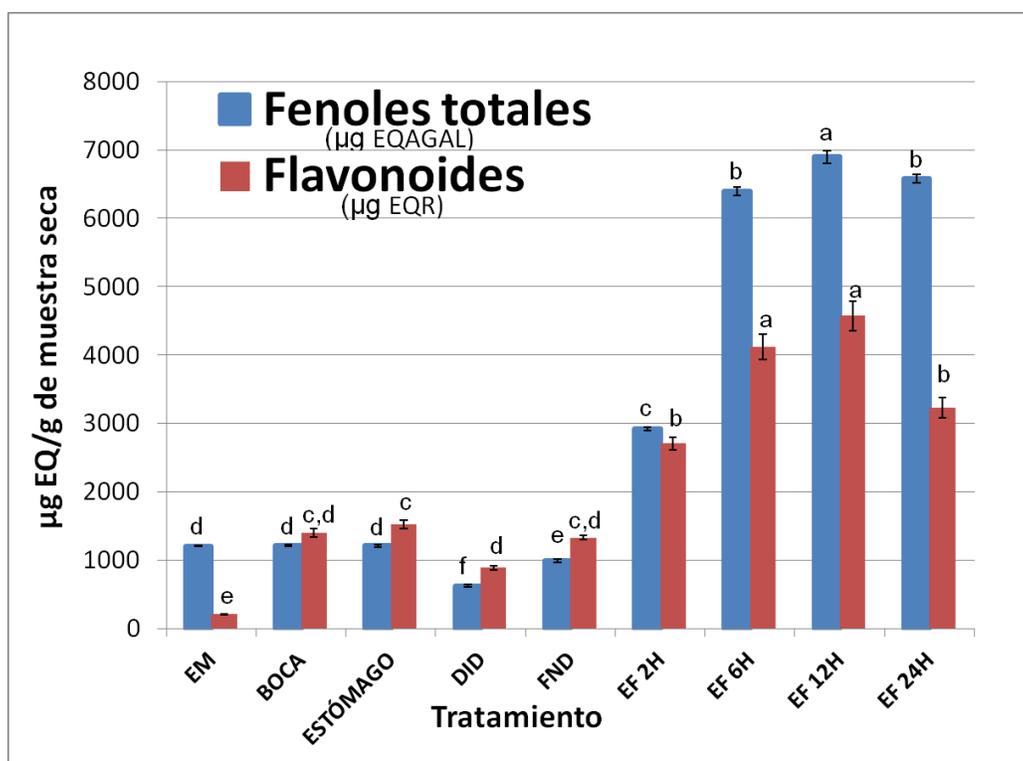


Figura 7. Contenido de fenoles totales y flavonoides durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

EM: Extracto metanólico; DID: Dentro de intestino delgado; FND: Fracción no digerible; EF: Extracto de fermentación colónica; H: Horas; EQ: Equivalentes; AGAL: Ácido gálico; R: Rutina; CAT: Catequina. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por grupo indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Comenzando con los FT (Figura 7), la concentración de estos en el EM no presentó diferencias significativas con respecto a boca y estómago, y fue ligeramente mayor que en la fracción no digerible (FND). La comparación de la concentración de FT del frijol común proveniente del EM (1205.95 μg EAGAL/g muestra) y de la FND (995.28 μg EAGAL/g muestra seca) corresponden con lo reportado por Saura-Calixto *et al.* (2007), quienes evaluaron FT en una mezcla de legumbres, las cuales incluían frijol; reportando que las muestras provenientes del extracto con solventes mostraron una concentración de FT ligeramente mayor que

las provenientes de la FND, siendo las concentraciones de 1540 y 1400 μg EAGAL/g muestra seca, respectivamente.

Con FND, nos referimos a la parte que no es digerida o absorbida en el intestino delgado y llega al colon, donde sirve como sustrato para la microflora fermentativa; en otras palabras son aquellos compuestos que escapan la degradación por enzimas intestinales (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

Continuando con la Figura 7, se puede observar que los FT presentan un gran incremento durante la fermentación colónica *in vitro* en los extractos de fermentación colónica evaluados (EF), siendo el de máxima concentración a las 12h (6899.46 μg EAGAL/g muestra seca). Esto se debe a que la microbiota actúa sobre los polímeros de compuestos fenólicos (proantocianidinas), los cuales al ser hidrolizados y liberados de la FND, aumentando la concentración de ácidos fenólicos en el medio (Déprez *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2005).

Con respecto a los flavonoides, en la Figura 7 se observa un comportamiento similar que en los FT con algunas diferencias. La concentración de flavonoides entre el EM y boca presentó diferencias significativas, siendo en esta última la que mostró una mayor concentración de estos compuestos. Esto se debe a que desde la boca comienza la hidrólisis de glucósidos de flavonoides, por la presencia y acción de la β -glucosidasa, lo cual se ve reflejado en el incremento de flavonoides libres en el medio (Grajek, 2007).

Siguiendo con la Figura 7, la concentración de flavonoides no presentó diferencias significativas en boca, estómago y en la FND. Esto se debe a que los glicósidos de flavonoides no sufren hidrólisis ácida en el estómago, pasando sin cambios al intestino delgado, donde se lleva a cabo la escisión del azúcar (Day *et al.*, 2001). Por ello, como se puede observar en la Figura 7, en la simulación del intestino delgado sí se presenta un incremento de flavonoides ya que la cantidad total de estos compuestos incluyen tanto los de la FND como los de DID.

Fue durante la fermentación colónica *in vitro*, donde se encontró un importante incremento en la concentración de flavonoides, donde su máximo se presentó a

las 6 y 12 h. Esto se debe a que la microbiota actúa hidrolizando enlaces glucosídicos y degradando cadenas de flavonoides a unidades simples, de esta forma se aumenta la concentración de flavonoides en el medio (Tarko *et al.*, 2013).

La bioaccesibilidad es la fracción de un compuesto que es liberada de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal, y en consecuencia, se convierte en disponible para su absorción (Parada y Aguilera, 2007). Considerando las más altas concentraciones de cada determinación como el 100% de bioaccesibilidad para los compuestos correspondientes, el incremento de la bioaccesibilidad que existe de FT y flavonoides durante la fermentación colónica *in vitro* (Figura 7) llega a ser del 85.57% y 70.89%, respectivamente, más alta que en la FND (Cuadro 8).

Taninos condensados durante digestión gastrointestinal *in vitro*

En el Cuadro 8 y Figura 8 se muestran los resultados de taninos condensados (TC) durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de la muestra. Se puede observar que la concentración de TC en el EM es mayor a los demás tratamientos. Esto se debe a que los extractos se encuentran en diferentes solventes, mientras que el EM está en metanol, el resto de los tratamientos se encuentra en solución acuosa. Se ha reportado para esta técnica de TC por Desphande y Cheyran (1985, 1987) que al aumentar el contenido de agua en la muestra se disminuye la absorbancia, y que esto puede deberse a que el pH depende del contenido de agua, afectando la estabilidad del producto coloreado (Cabannes, 1953; Sun *et al.*, 1998).

Si bien con esta técnica no se puede realizar una comparación entre el EM y los demás tratamientos, ya que la concentración de TC de estos últimos está subestimada. Sí se puede realizar una comparación solamente entre los tratamientos de la digestión gastrointestinal *in vitro* ya que todos se encuentran en solución acuosa.

Los TC o proantocianidinas, son oligómeros y polímeros de subunidades de flavonol. Por tanto, estos varían en tamaño, tipo de enlaces y composición monomérica dependiendo de la especie de planta, tejido y estado de desarrollo (Marles *et al.*, 2003). En la Figura 8 se puede observar que la concentración de TC

en boca no presentó diferencias significativas con respecto al estómago; y que esta fue ligeramente mayor que en la FND. Durante la fermentación colónica *in vitro* los TC mostraron un gran incremento siendo mayor a las 12h, la cual no presentó diferencias significativas con respecto a la muestra de 6h.

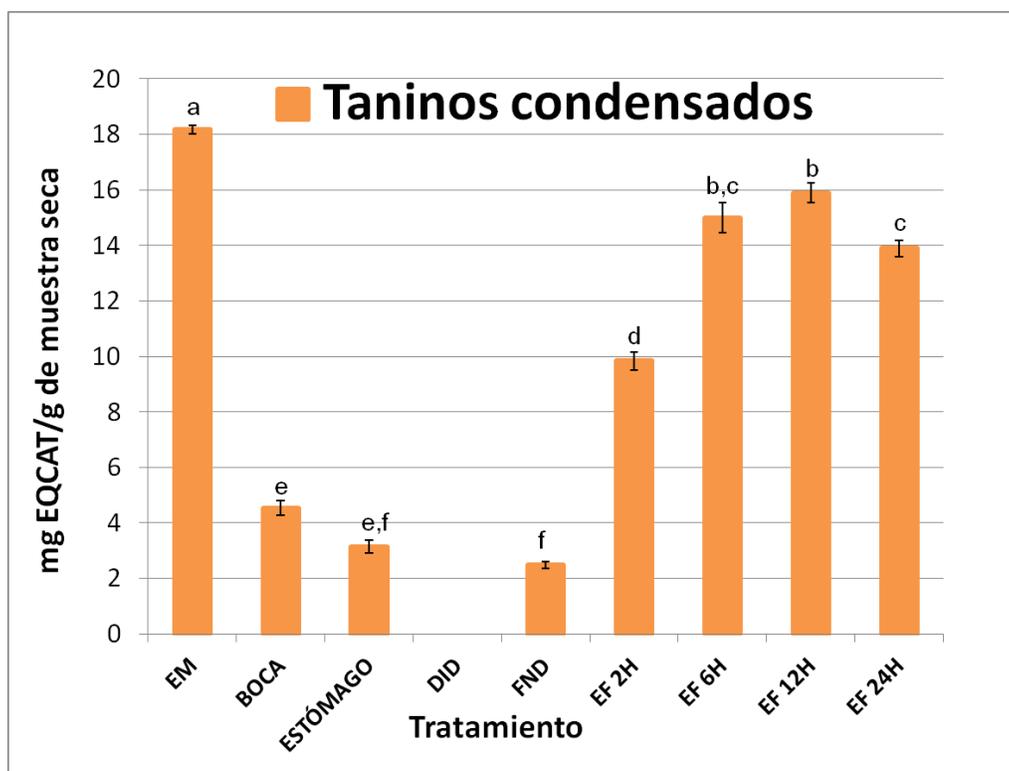


Figura 8. Contenido de taninos condensados durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

EM: Extracto metanólico; DID: Dentro de intestino delgado; FND: Fracción no digerible; EF: Extracto de fermentación colónica; H: Horas; EQ: Equivalentes; AGAL: Ácido gálico; R: Rutina; CAT: (+)-Catequina. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por grupo indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

El que no hubiese un incremento de los TC en las primeras etapas de la digestión (boca, estómago y FND; Figura 8) se debe a que estos son parte de los compuestos fenólicos no extraíbles, ya que se ha demostrado que después de su ingestión no son liberados de la matriz del alimento, ni por masticación, ni por el pH ácido del estómago, ni por la acción de enzimas digestivas, sino que llegan al

colon prácticamente intactos, donde son sujetos a transformación por la microbiota (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013). Es por ello, que los TC incrementan su concentración durante la fermentación colónica *in vitro* (Figura 8), ya que la degradación de estos compuestos da lugar a unidades más pequeñas. Las cuales al incrementar su concentración en el medio aumentan su determinación con la técnica utilizada.

La bioaccesibilidad de TC llega a incrementar hasta un 85.39% durante la fermentación colónica *in vitro*, esto comparando contra los TC de la FND.

Absorción en intestino delgado de FT, flavonoides y TC

En la Figura 9 se muestra el porcentaje de absorción de CF en condiciones de ID. Se puede observar que del total de los CF bioaccesibles en ID, refiriéndonos a fenoles totales (FT) y flavonoides, se absorbieron 38.47% y 40.02%, respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre estas dos determinaciones. Esto concuerda con lo reportado por Akillioglu y Karakaya (2010), quienes realizaron el proceso digestivo *in vitro*, evaluando los FT en el dializado del frijol común, obteniendo para la condición de cocción más similar a la nuestra un 39.52% de biodisponibilidad. El término de biodisponibilidad *in vitro* de FT representa la cantidad de FT liberados de la matriz alimentaria y que tiene la habilidad de pasar a través de la barrera intestinal. Por esta razón, los polifenoles que pueden pasar a través de la barrera intestinal pueden absorberse a través de la mucosa intestinal y entonces ser metabolizados (Akillioglu y Karakaya, 2010).

Por otra parte, Mosele *et al.* (2015) estudiaron la absorción de compuestos fenólicos durante la simulación de ID en productos de granada, determinando para los flavonoides bioaccesibles en ID una absorción de 42.58%,

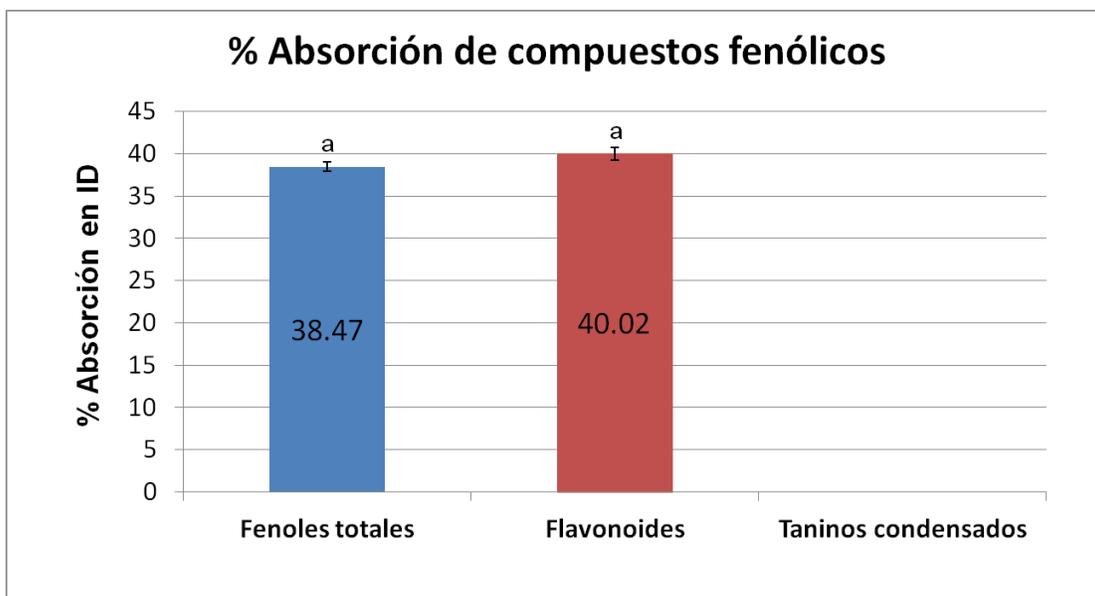


Figura 9. Absorción de compuestos fenólicos en condiciones de intestino delgado. ID: Intestino delgado. Media \pm ES (n=3). Por grupo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

Por otra parte, en la Figura 9 también se muestra que no se detectó la absorción de TC; esto puede deberse a que los TC de frijol común presentes en el ID son oligómeros (>tetrámeros) y polímeros de flavon-3-oles, los cuales no fueron hidrolizados por enzimas intestinales, y por tanto no pueden ser absorbidos, ya que no se llevó a cabo la reducción de su tamaño. Saura-Calixto *et al.* (2007) observó que las enzimas digestivas no fueron capaces de liberar o aumentar la bioaccesibilidad de proantocianidinas (TC) en una matriz alimentaria compuesta de distintos grupos de alimentos de la dieta española, sugiriendo que la alta polimerización de proantocianidinas alcanza al colon sin alteración. Resultados sugieren que trímeros y dímeros de proantocianidinas podrían ser absorbidos en ID (Deprez *et al.*, 2001).

6.2.1.2 Ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC

En el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de ácidos fenólicos y flavonoides mediante HPLC-DAD durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del frijol común BM.

Extracto metanólico

Los resultados obtenidos en el EM de frijol común (Cuadro 9), se asemejan a los obtenidos por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014), quienes evaluaron varios compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD, para la misma variedad de frijol común que se usó en este trabajo (BM), esto en tres diferentes cosechas (2008, 2010, 2011) y en condiciones de cocción similares.

Cuadro 9. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) de ácidos fenólicos y flavonoides durante la digestión gastrointestinal *in vitro* mediante HPLC-DAD.

| | ÁCIDOS FENÓLICOS | | | | FLAVONOIDES | |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | Ác. caféico | Ác. clorogénico | Ác. cumárico | Ác. ferúlico | Ác. gálico | (+)-Catequina |
| EM | 13.36 \pm 0.14 ^{c,d} | 36.51 \pm 0.36 ^d | 0.97 \pm 0.03 ^{f,g} | 6.94 \pm 0.08 ^c | 111.64 \pm 6.30 ^e | 97.72 \pm 1.44 ^d |
| Boca | 40.15 \pm 1.16 ^a | 718.40 \pm 23.55 ^a | 7.56 \pm 0.10 ^b | 35.50 \pm 0.49 ^b | 477.97 \pm 1.75 ^d | 595.24 \pm 23.37 ^a |
| Estómago | 35.39 \pm 0.72 ^a | 487.56 \pm 10.89 ^b | 3.25 \pm 0.19 ^{c,d} | 7.04 \pm 0.41 ^c | 973.25 \pm 12.17 ^c | 667.26 \pm 12.66 ^a |
| DID | 10.40 \pm 0.41 ^{c,d} | 197.41 \pm 9.78 ^c | 2.69 \pm 0.14 ^{d,e} | 3.26 \pm 0.10 ^d | 486.69 \pm 18.58 ^d | 134.67 \pm 8.85 ^d |
| FND | 28.31 \pm 2.62 ^b | 503.71 \pm 43.68 ^b | 4.06 \pm 0.26 ^c | 9.55 \pm 0.61 ^c | 929.18 \pm 32.77 ^c | 462.55 \pm 34.45 ^b |
| 2 h | 15.39 \pm 1.51 ^c | 17.26 \pm 0.97 ^d | 11.49 \pm 0.43 ^a | 43.17 \pm 1.29 ^a | 2141.20 \pm 19.12 ^b | 178.00 \pm 7.37 ^d |
| 6 h | 9.53 \pm 0.28 ^d | <LD | 3.75 \pm 0.27 ^{c,d} | 8.70 \pm 0.40 ^c | 2930.39 \pm 57.75 ^a | 446.37 \pm 19.23 ^b |
| 12 h | 2.28 \pm 0.28 ^e | <LD | 0.59 \pm 0.08 ^g | 1.76 \pm 0.06 ^d | 2642.79 \pm 93.98 ^a | 497.65 \pm 18.55 ^b |
| 24 h | 2.18 \pm 0.30 ^e | <LD | 2.03 \pm 0.08 ^{e,f} | <LD | 2788.28 \pm 116.78 ^a | 336.39 \pm 31.55 ^c |

EM: extracto metanólico; DID: dentro de intestino delgado/absorbido; FND: fracción no digerible; EF: extracto de fermentación colónica; h: horas; <LD: menor al límite de detección. Media \pm ES(n=3). Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

En el EM se obtuvo una concentración de 13.36 μg de ácido caféico /g muestra seca (Cuadro 9), la cual se encuentra dentro de lo reportado 5.08-18.94 μg de ácido caféico /g muestra seca (Xu y Chang, 2009; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014).

Con respecto a los ácidos clorogénico y cumárico en el EM, estos presentaron concentraciones de 36.51 y 0.97 $\mu\text{g/g}$ muestra seca, respectivamente. Las cuales fueron ligeramente menores a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014), con rangos de concentración de 49.4-227.99 μg de ácido clorogénico /g muestra seca y 1.86-2.22 μg de ácido cumárico /g muestra seca.

Continuando con el ác. ferúlico la concentración que se obtuvo en el EM fue de 6.94 µg/g muestra seca, esta concentración fue mayor a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014) cuyo rango fue desde no detectado a 2.04 µg ác. ferúlico /g muestra seca. Otros autores reportan concentraciones de ác. ferúlico de 2.16-23.3 µg/g muestra seca, esto para diferentes variedades de frijol común sometidos a tratamiento térmico (Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Aguilera *et al.*, 2011).

El ác. gálico fue el ácido fenólico mayoritario en el EM de frijol común variedad BM, lo cual corresponde a lo reportado Ramírez-Jiménez *et al.* (2014) presentando una concentración de 111.64 µg de ác. gálico /g muestra seca, la cual fue ligeramente mayor a la reportada 34.42-103.01 µg/g muestra seca (Xu y Chang, 2009; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014).

Finalmente, la concentración de (+)-catequina en el EM fue de 97.72 µg/g muestra seca, menor al rango reportado por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014) con 315.85-630.62 µg/g muestra seca. Sin embargo, lo obtenido se encuentra dentro de lo reportado para frijol común por otros autores 76.25-126.1 µg de (+)-catequina /g muestra seca (Xu y Chang, 2009; Aguilera *et al.*, 2011).

Las diferencias pueden atribuirse a los diferentes métodos de extracción, a las condiciones ambientales de crecimiento de la planta; así como al año de cosecha.

Ácidos fenólicos y (+)-catequina durante digestión gastrointestinal *in vitro*

A continuación se da una descripción de los resultados obtenidos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* para los ácidos fenólicos y (+)-catequina. Posterior a esta descripción se dará una explicación en el apartado de *recapitulación*.

- Ácido caféico

El ác. caféico presentó mayor concentración en boca que en el EM, la cual se mantuvo en estómago, no presentando diferencias significativas con este (Cuadro 9). La suma de FND+DID del ác. caféico corresponde al total de ác. caféico

bioaccesible en la simulación de intestino delgado (ID), dando una concentración de 38.71 $\mu\text{g/g}$ muestra seca, la cual no presentó diferencias significativas con boca y estómago (Figura 10). De la concentración de ác. caféico bioaccesible en condiciones de ID (FND+DID), el 26.86% fue absorbido (Figura 16).

En el Cuadro 9 y la Figura 10, se observa que conforme aumenta el tiempo de fermentación colónica *in vitro* existe una disminución en la concentración del ácido caféico. Las concentraciones más altas de ácido caféico se presentaron en boca, estómago y FND+DID.

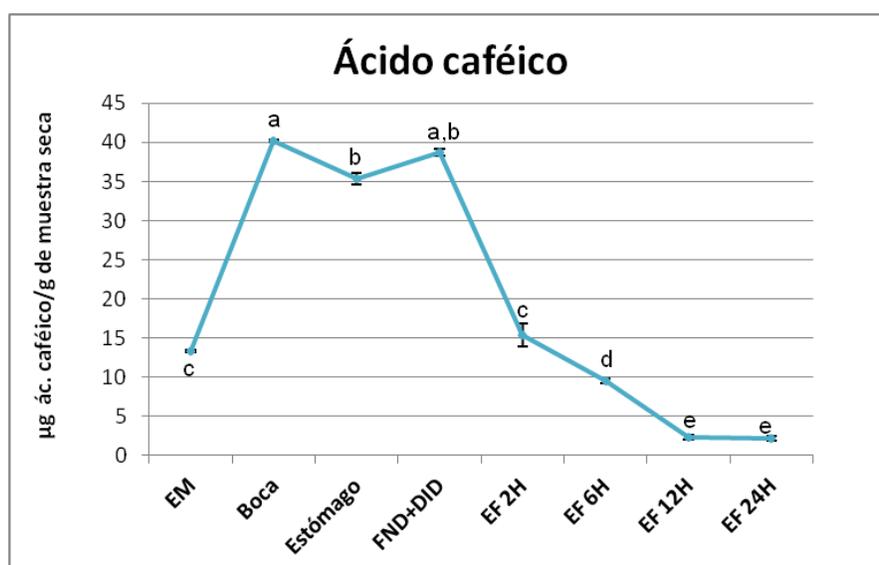


Figura 10. Concentración de ác. caféico durante la digestión *in vitro*.

EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

- **Ácido clorogénico**

El ác. clorogénico tuvo un importante incremento en boca, después disminuyó su concentración en estómago, la cual no presentó diferencias significativas con la FND (Cuadro 9). Tomando en cuenta la suma entre FND+DID (701.12 μg de ác. clorogénico/g muestra seca) se puede observar que esta concentración no presenta diferencias significativas con boca (Figura 11). El 28.16% del ác. clorogénico bioaccesible en condiciones de ID fue absorbido (Figura 16).

Durante la fermentación colónica *in vitro* la concentración de ácido clorogénico disminuye drásticamente hasta no ser detectable a las 6, 12 y 24 h (Cuadro 9 y Figura 11). La concentración máxima de ácido clorogénico se presentó en boca y FND+DID (Figura 11).

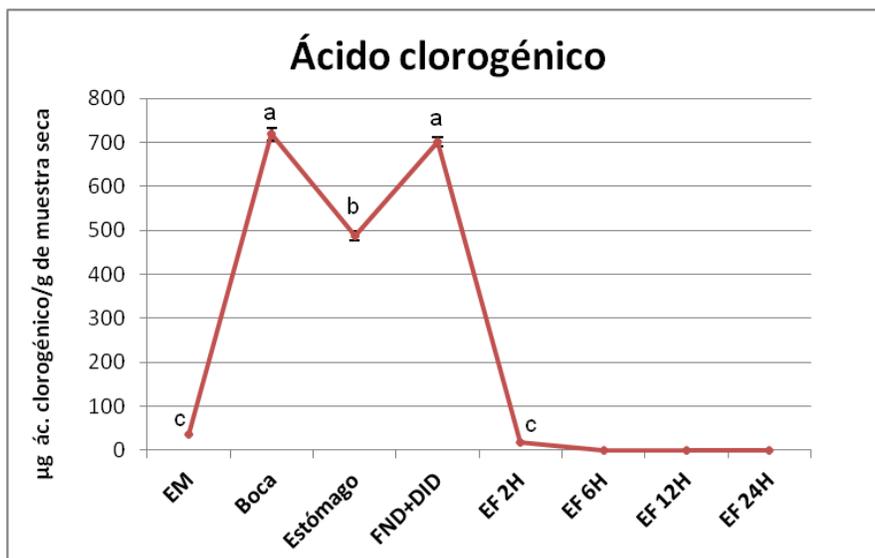


Figura 11. Concentración de ácido clorogénico durante la digestión *in vitro*. EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

- **Ácido cumárico**

La concentración del ácido cumárico, al igual que el compuesto anterior, aumentó en boca y disminuyó en estómago. La concentración en estómago no presentó diferencias significativas con la FND (Cuadro 9). Sin embargo, la suma de FND+DID (6.75 µg de ácido cumárico/g muestra seca) fue mayor a estómago, no presentando diferencias significativas con boca (Figura 12). En intestino delgado se absorbió el 39.84% del ácido cumárico bioaccesible en la simulación de ID (Figura 16), siendo el compuesto estudiado que presentó una más alta absorción.

En la Figura 12 se puede observar que durante las primeras 2 horas de fermentación colónica *in vitro* se presenta un incremento de ácido cumárico; sin

embargo, una vez que se continua la fermentación disminuye su concentración. La concentración máxima de ácido cumárico bioaccesible se presentó durante fermentación colónica *in vitro* a las 2 h (Figura 12).

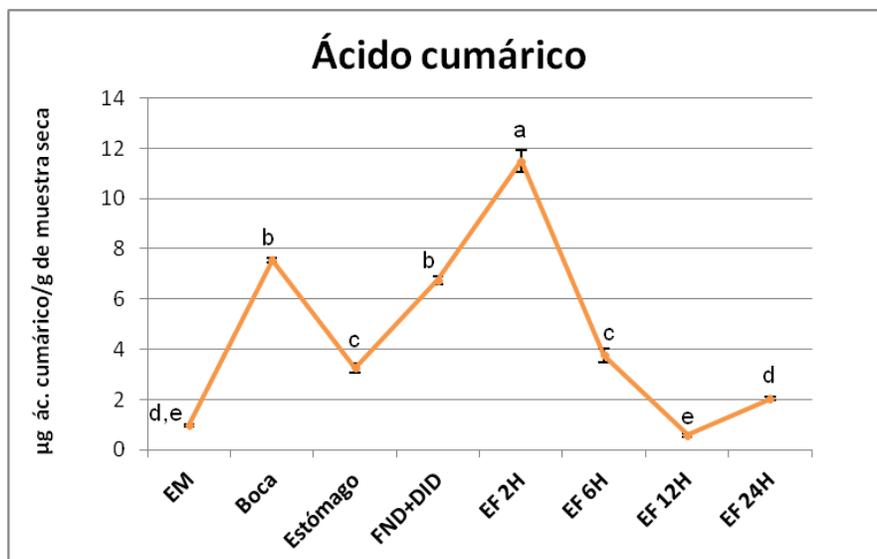


Figura 12. Concentración de ácido cumárico durante la digestión *in vitro*. EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

- **Ácido ferúlico**

El ácido ferúlico mostró un incremento en boca; después su concentración disminuyó en estómago, no presentando diferencias significativas con la FND (Cuadro 9). De la concentración total bioaccesible de ácido ferúlico en condiciones de ID (FND+DID), se absorbió el 25.46% (Figura 10).

En la Figura 13 se muestra un aumento en la concentración del ácido ferúlico a las 2h de fermentación colónica *in vitro*. En las horas posteriores disminuyó hasta no ser detectable. La concentración máxima de ácido ferúlico bioaccesible se presentó durante fermentación colónica *in vitro* a las 2 h (Figura 13).

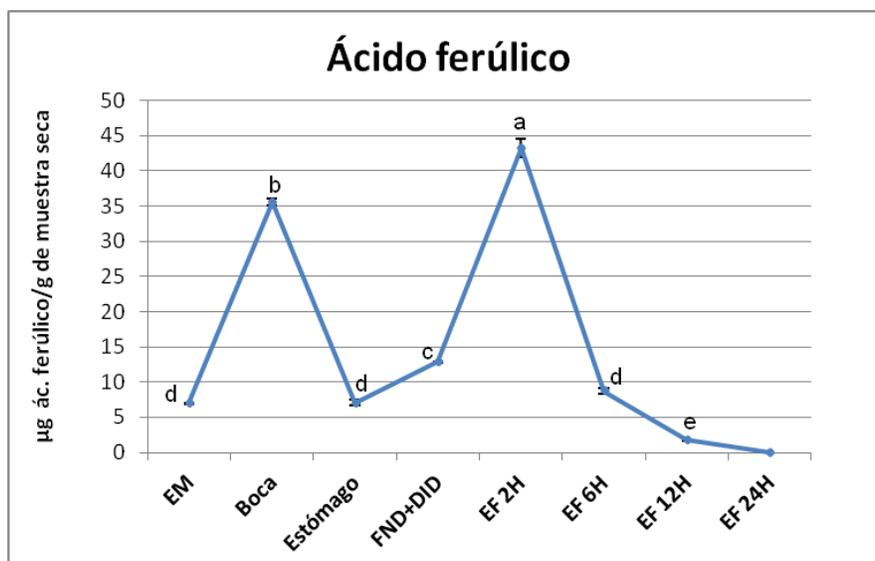


Figura 13. Concentración de ácido ferúlico durante la digestión *in vitro*. EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

- **Ácido gálico**

El ácido gálico fue el ácido fenólico mayoritario en todas las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*; con excepción de boca, donde el mayoritario fue el ácido clorogénico (Cuadro 9).

En el Cuadro 9 y Figura 14 se puede observar que la concentración del ácido gálico es mayor en boca que en el EM; después en la simulación del estómago su concentración incrementa considerablemente, la cual no presentó diferencia significativa con la FND (Cuadro 9). Sin embargo, la concentración total de ácido gálico bioaccesible en condiciones de ID (FND+DID; 1415.87 µg de ácido gálico/g muestra seca) fue mayor que en el estómago (Figura 14). El porcentaje de absorción de ácido gálico en condiciones de ID fue del 34.37% (Figura 16).

Como se puede observar en la Figura 14, durante la fermentación colónica *in vitro* la concentración del ácido gálico siguió en aumento, siendo mayor a las 6 h, la cual no presentó diferencias significativas con extractos de 12 y 24 h.

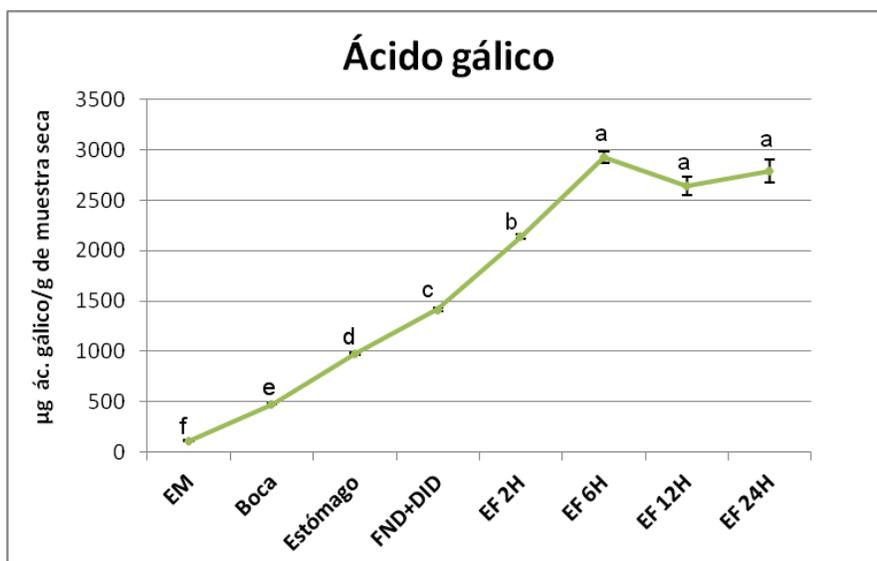


Figura 14. Concentración de ác. gálico durante la digestión *in vitro*.

EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

- (+)-Catequina

La concentración de (+)-catequina en boca fue mayor que en el EM, y no presentó diferencias significativas con estómago (Cuadro 9 y Figura 15). En la FND la concentración de (+)-catequina fue menor que en boca (Cuadro 9), pero tomando en cuenta que la simulación de ID incluye tanto FND como DID, se puede realizar la comparación entre las concentraciones de boca, estómago y FND+DID (597.22 µg de (+)-catequina/g muestra seca), las cuales no presentaron diferencias significativas (Figura 15). De la (+)-catequina bioaccesible en el ID el 22.55% fue absorbida (Figura 16).

En las primeras 2 h de la fermentación colónica *in vitro* disminuyó la concentración de (+)-catequina, después a las 6 y 12 h aumentó y finalmente disminuyó otra vez a las 24h (Figura 15). La concentración máxima de (+)-catequina se presentó en boca, estómago y FND+DID.

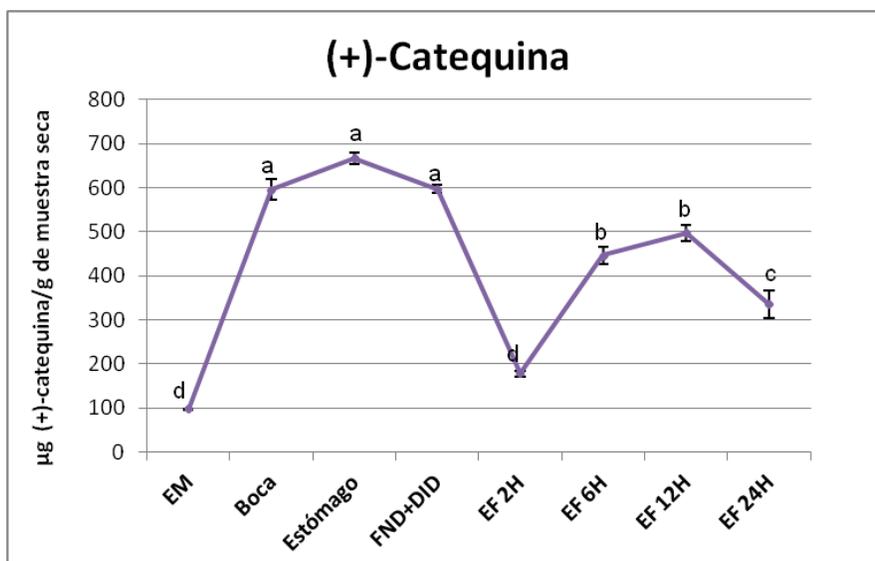


Figura 15. Concentración de (+)-catequina durante la digestión *in vitro*. EM: extracto metanólico; FND+DID: Fracción no digerible + dentro de intestino delgado (corresponde a la bioaccesibilidad del compuesto en condiciones de intestino delgado); EF: extracto de fermentación colónica; h: horas. Media \pm ES (n=3). Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

- **Recapitulación de cambios en el contenido de ácidos fenólicos y (+)-catequina durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.**

Todos los ácidos fenólicos estudiados y la (+)-catequina mostraron una mayor concentración en boca que en el EM (Cuadro 9 y Figuras 10-14). La liberación de estos compuestos puede deberse a la acción de la enzima β -glucosidasa en boca, la cual hidroliza enlaces glucosídicos (Grajek, 2007); así como también a la acción de la masticación, que rompe la matriz alimentaria, permitiendo la liberación de estos compuestos al medio (Lee *et al.*, 2006; Marquardt y Watson, 2014).

En condiciones de estómago todos los ácidos fenólicos disminuyeron su concentración con excepción del ácido gálico (Figura 10-14). Mosele *et al.* (2015) reportan el mismo comportamiento para los ácidos fenólicos en productos de granada; el cual puede deberse a la baja estabilidad de los ácidos fenólicos en condiciones gástricas (Vallejo *et al.*, 2004; Kamiloglu y Capanoglu, 2014). En el caso de (+)-catequina, se puede observar que su concentración se mantiene en estómago (Figura 15), esto concuerda con varios estudios, que reportan que los

flavonoides no se ven afectados por condiciones gástricas (Vallejo *et al.*, 2004; Bouayed *et al.*, 2012).

En ID (FND+DID) los compuestos fenólicos no presentaron diferencias significativas con respecto a las concentraciones obtenidas en boca; a excepción del ác. gálico, que aumentó, y ác. ferúlico, que disminuyó (Figuras 10-15).

En las Figuras 10 y 11 se puede observar que el ác. caféico y clorogénico presentan tendencias muy similares. Estos ácidos fenólicos disminuyen su concentración una vez comenzada la fermentación colónica *in vitro*. Rechner *et al.*, (2004), reportan que el ácido clorogénico se ve completamente degradado en las primeras 4 h de fermentación colónica *in vitro*, y que uno de sus productos de degradación es el ácido caféico, que tarda alrededor de 24 h en quedar completamente degradado.

Así mismo, se puede observar un comportamiento similar entre el ác. cumárico y ác. ferúlico (Figura 12 y 13), estos ácidos fenólicos incrementaron su concentración en las 2 primeras horas de la fermentación colónica *in vitro*, y después disminuyó. Stalmach *et al.*, (2013) estudiaron la fermentación colónica *in vitro* de compuestos fenólicos en jugo de uva, reportando una disminución pronunciada del ác. cumárico y ferúlico a partir de la segunda hora de fermentación; en su estudio estos ácidos fenólicos fueron liberados de los estéres de tartarato, alcanzando su máximo entre 0 y 2 h de incubación, después de este periodo estuvieron prácticamente ausentes en el medio.

En el caso del ácido gálico, su concentración se ve en constante aumento desde el inicio de la digestión gastrointestinal *in vitro*, llegando a una concentración máxima a las 6, 12 y 24 h de la fermentación colónica *in vitro* (Figura 14). Se ha reportado que el frijol común presenta ácido elágico, lo que sugiere la presencia de taninos hidrolizables, ya que este ácido proviene de la hidrólisis de elagitaninos (González de Mejía *et al.*, 1999). También se ha determinado la presencia de fenoles hidrolizables y polifenoles hidrolizables en frijol común (Grajales-García, 2010; Treviño-Mejía, 2013).

Mosele *et al.* (2015), mencionan que los taninos hidrolizables pueden ser hidrolizados durante la digestión bajo condiciones ácidas (etapa gástrica) y alcalinas (etapa del ID), resultando en un incremento de los monómeros que componen a estos taninos. Es por ello, que en las primeras etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* del frijol común, el ácido gálico pudo haber sido generado por la hidrólisis de polifenoles hidrolizables y de ácido gálico glucósilado.

Van Dorsten *et al.* (2012) y Mosele *et al.* (2015) demostraron un incremento gradual de ácido gálico en la fermentación colónica *in vitro* de un extracto de té negro y de productos de granada, respectivamente. Mosele *et al.* (2015) lo atribuye a la hidrólisis de elagitaninos (Liu *et al.*, 2013) y a la liberación de ácido gálico de la matriz alimentaria hacia el medio de la fermentación como consecuencia de la actividad microbiana (Saura-Calixto *et al.*, 2010). Así mismo, en este trabajo se obtuvo un incremento de la concentración de ácido gálico durante la fermentación colónica *in vitro* del frijol común, que pudo deberse a la degradación de taninos hidrolizables y a la ruptura de ácido gálico glucósilado presente en la FND del frijol común por la microbiota presente en inóculo fecal.

Absorción en intestino delgado de ácidos fenólicos y (+)-catequina.

En la Figura 16 se muestra el porcentaje de absorción de ácidos fenólicos y (+)-catequina en condiciones de intestino delgado (ID). El total de compuestos bioaccesibles en ID corresponde a la suma de los compuestos de la FND (no absorbidos) y de DID; siendo DID los compuestos absorbidos (Cuadro 3).

El orden de absorción de los compuestos fenólicos de mayor a menor es el siguiente: ác. cumárico \geq ác. gálico \geq ác. clorogénico \geq ác. caféico = ác. ferúlico = (+)-catequina (Figura 16). El promedio entre los porcentajes de absorción de estos compuestos es del 29.54% y para los ácidos fenólicos es del 30.94%. Este último concuerda con los resultados obtenidos por Mosele *et al.* (2015), quienes estudiaron la absorción de compuestos fenólicos durante la simulación de ID de productos de granada, determinando para los ácidos fenólicos bioaccesibles en ID una absorción de 28.90%.

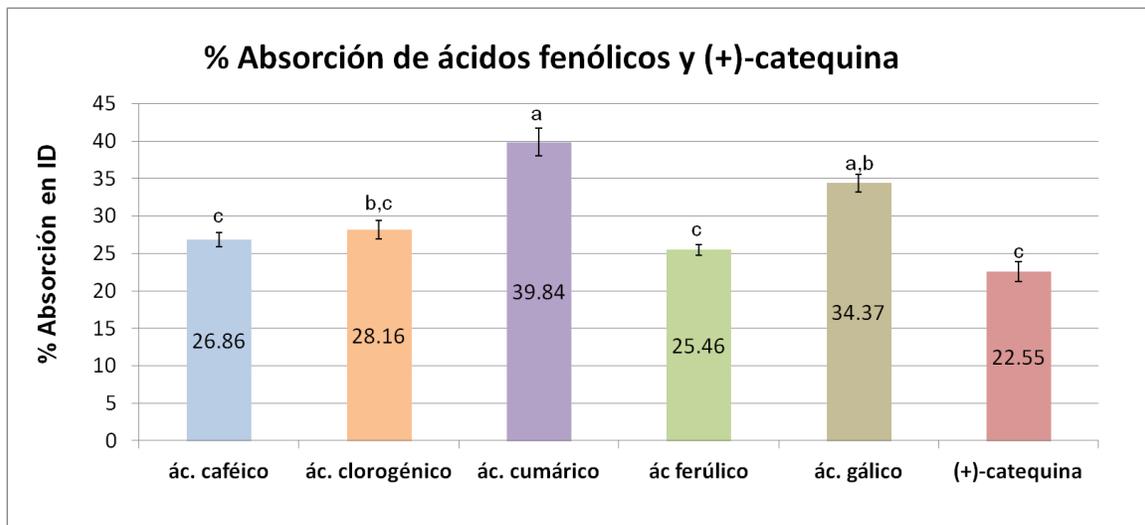


Figura 16. Absorción de ácidos fenólicos y (+)-catequina en condiciones de ID. ID: Intestino delgado. Media \pm ES (n=3). Por grupo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey

En un estudio realizado por Borges *et al.* (2013), reportaron que en el intestino delgado se llevaba a cabo la absorción del 40% de compuestos fenólicos ingeridos a partir de una bebida. Dicho estudio se realizó en humanos tomando muestras del fluido ileal, el porcentaje de absorción se determinó comparando contra la concentración inicial de la bebida. En este mismo estudio se determinó para ácido gálico una absorción en el ID del 27.2%; Xuan *et al.* (2014) y Mosele *et al.* (2015) determinaron en productos de granada la absorción del ácido gálico en ID, reportando valores del 10.26%-33.33% y del 32.12%, respectivamente.

Por otra parte, Donovan *et al.* (2001) realizaron un estudio en el que determinaron la absorción de la catequina en ID, siendo esta del 35%; mientras que Carbonaro *et al.* (2001) en intestino de rata reportan una absorción del 30%.

6.2.2 Capacidad antioxidante

En el Cuadro 10 se muestra la capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, mediante dos métodos: ABTS y FRAP.

Capacidad antioxidante por ABTS

Este método puede ser utilizado en un amplio intervalo de pH y se aplica para sistemas tanto acuosos como orgánicos (Restrepo-Sánchez *et al.*, 2009). A diferencia del radical DPPH, que involucra transferencia de hidrógenos; el radical ABTS involucra tanto la transferencia de átomos de H como de electrones (Gülçin, 2012).

Para el EM del frijol común se obtuvo una capacidad antioxidante (ABTS) de 7.73 $\mu\text{mol TEAC/g}$ muestra seca (Cuadro 10). Este resultado se encuentra dentro de lo reportado por Marathe *et al.* (2011), quienes evaluaron en cinco variedades de frijol común la capacidad antioxidante (ABTS), obteniendo resultados entre 6.04 y 23.86 $\mu\text{mol TEAC/g}$, dependiendo de la variedad. Treviño-Mejía (2013) para la misma variedad de frijol común (BM) reporta una capacidad antioxidante (ABTS) de 4.14 $\mu\text{mol TEAC/g}$ muestra seca.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

| TRATAMIENTO | ABTS | FRAP |
|-----------------|--|---|
| | ($\mu\text{mol TEAC/g}$ muestra seca) | ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ muestra seca) |
| EM | 7.73 \pm 0.31 ^d | 13.11 \pm 0.16 ^b |
| Boca | 13.83 \pm 0.29 ^c | 13.29 \pm 0.36 ^b |
| Estómago | 9.43 \pm 0.41 ^d | 14.95 \pm 0.23 ^a |
| DID | 3.51 \pm 0.30 ^e | 11.63 \pm 0.50 ^c |
| FND | 7.75 \pm 0.22 ^d | 11.24 \pm 0.34 ^c |
| EF | | |
| 2 h | 52.58 \pm 0.41 ^b | 9.54 \pm 0.32 ^{d,e} |
| 6 h | 55.06 \pm 1.55 ^{a,b} | 8.91 \pm 0.26 ^e |
| 12 h | 56.61 \pm 1.32 ^a | 10.68 \pm 0.30 ^{c,d} |
| 24 h | 51.48 \pm 1.48 ^b | 8.18 \pm 0.32 ^e |

DID: dentro de intestino delgado; FND: fracción no digerible; EF: extracto de fermentación; h: horas; TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de trolox. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

En la Figura 17 se muestran los cambios de la capacidad antioxidante (ABTS) conforme se lleva a cabo la digestión gastrointestinal *in vitro*. Se puede observar

que la capacidad antioxidante incrementó de forma importante durante la fermentación colónica. Cabe destacar, que las variaciones de la capacidad antioxidante, mediante ABTS, tuvieron correlación significativa con los CF bioaccesibles en las determinaciones de fenoles totales, flavonoides, taninos condensados y ác. gálico (HPLC) (Figura 7, 8, 14), para cada etapa del proceso de digestión, presentándose correlaciones entre 0.8919 y 0.9516 (Cuadro 11).

Estos resultados indican que los compuestos fenólicos que se van liberando de la matriz alimentaria, contribuyen de forma importante a la capacidad antioxidante, en este caso medida por el método de ABTS, el cual informa de la capacidad de los compuestos contenidos en la muestra para estabilizar el radical $ABTS^+$, ya sea por transferencia de electrones o de átomos de H.

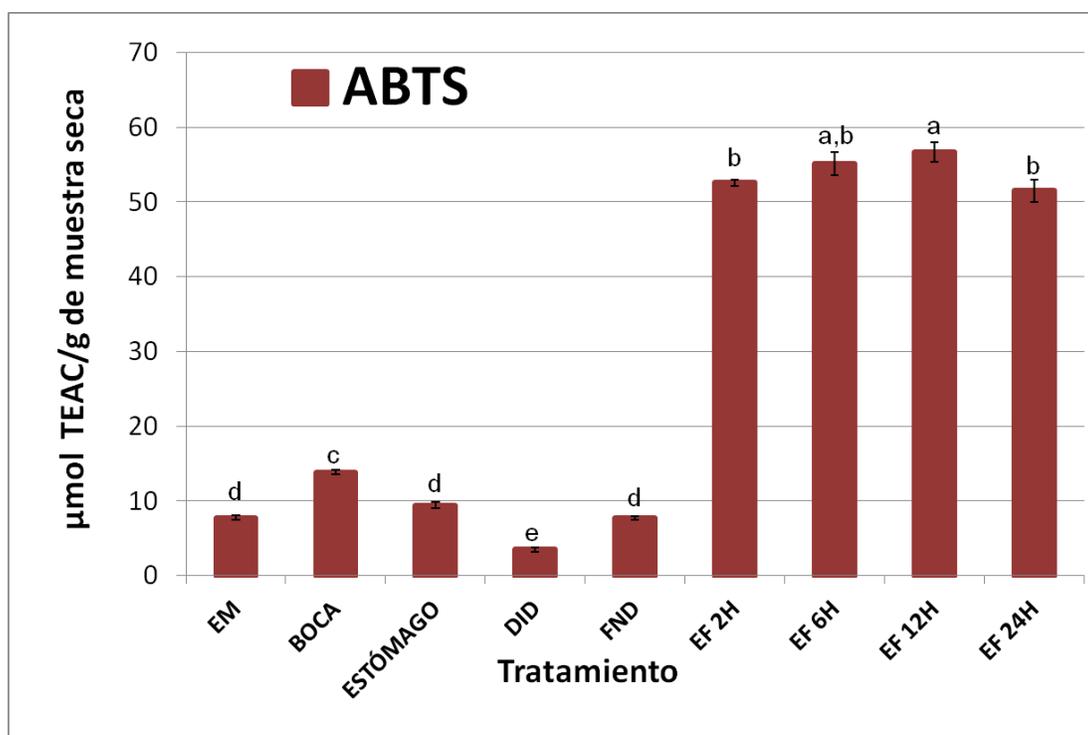


Figura 17. Capacidad antioxidante (ABTS) durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

EM: Extracto metanólico; DID: Dentro de intestino delgado; FND: Fracción no digerible; EF: Extracto de Fermentación; H: Horas; TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de trolox. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por grupo indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Cuadro 11. Correlaciones entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

| | ABTS | FRAP | Fenoles totales |
|----------------------------|---------------|---------------|------------------------|
| Fenoles totales | 0.8919 | -0.5983 | 1.0000 |
| Flavonoides | 0.8973 | -0.5064 | 0.9255 |
| Taninos condensados | 0.9365 | -0.6346 | 0.9649 |
| Ác. Caféico | -0.7191 | 0.6542 | -0.7704 |
| Ác. Cumárico | -0.0086 | -0.1266 | -0.4074 |
| Ác. Clorogénico | -0.6564 | 0.6666 | -0.5991 |
| Ác. Ferúlico | 0.1150 | -0.2582 | -0.2696 |
| Ác. Gálico | 0.9516 | -0.6526 | 0.9381 |
| (+)-Catequina | -0.1364 | 0.5818 | 0.0218 |

El coeficiente de correlación fue calculado de acuerdo al método de Pairwise.

Capacidad antioxidante por FRAP

Este método ha sido adaptado y usado para probar antioxidantes en diferentes alimentos o bebidas (Pellegrini *et al.*, 2003). El poder reductor refleja la habilidad de los compuestos para modular el tono redox en plasma y tejidos (Gülçin, 2012).

El EM del frijol común presentó una capacidad antioxidante (FRAP) de 13.29 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ muestra seca (Cuadro 10); Marathe *et al.* (2011) reportan una capacidad antioxidante entre 10.22 y 34.41 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ para cinco variedades de frijol común. Baardseth *et al.* (2010) obtuvieron una capacidad antioxidante (FRAP) del 0.17 al 2.6 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ para una variedad de frijol común, usando distintos métodos de cocción. También Xu y Chang (2009) muestran resultados de capacidad antioxidante entre 10 y 40 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ para dos variedades de frijol común con diferentes métodos de cocción.

En la Figura 18 se muestra la capacidad antioxidante con la prueba de FRAP, esta se comporto de forma diferente que la prueba de ABTS (Figura 17). De hecho, los valores más bajos de FRAP se presentaron durante la fermentación colónica *in vitro*. Serrano *et al.* (2007) también reportaron para legumbres, que la capacidad antioxidante medida mediante FRAP fue más baja durante la fermentación

colónica *in vitro*; sugiriendo que esto se podía deber a que algunos antioxidantes liberados de la matriz alimentaria durante la fermentación colónica sirvieron de sustrato para el metabolismo bacteriano. Lo que concuerda con las correlaciones entre FRAP con ácido caféico, clorogénico y (+)-catequina (Cuadro 11), que están entre 0.5818 y 0.6666; ya que estos compuestos se ven disminuidos durante la fermentación colónica *in vitro* (figura 10, 11 y 15); así como estos compuestos, otros que no fueron determinados en este trabajo pudieran haber sido usados por la microbiota, disminuyendo la capacidad reductora de la muestra.

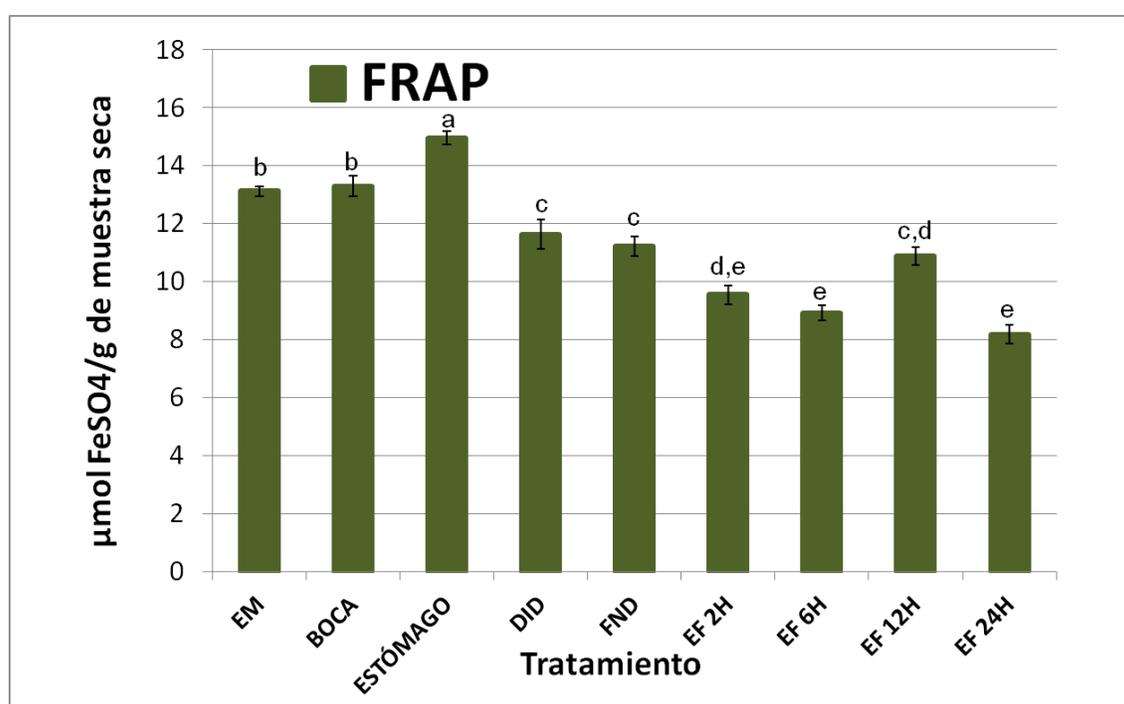


Figura 18. Capacidad antioxidante (FRAP) durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

EM: Extracto metanólico; DID: Dentro de intestino delgado; FND: Fracción no digerible; EF: Extracto de Fermentación; H: Horas; TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de trolox. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por grupo indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Se ha informado que ambas técnicas, ABTS y FRAP, son adecuadas para mediar la capacidad antioxidante de frutas y hortalizas, y que los antioxidantes contenidos en este tipo de materiales tienen diferente reactividad frente a los dos métodos (Prior *et al.*, 2005). Cabe mencionar, que los mecanismos de acción de estas

técnicas son distintos, mientras que el mecanismo de reacción en FRAP es por transferencia de electrones, el de ABTS es tanto por transferencia de electrones como por transferencia de átomos de H (Nilsson *et al.*, 2005).

Por otra parte, Kamiloglu y Capanoglu (2014) reportan diferencias en sus ensayos de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) entre las muestras gástricas e intestinales; con lo cual ellos sugieren que se consideren los pH de las pruebas de capacidad antioxidante. Ya que es bien sabido que la capacidad para captura de radicales de los polifenoles, es altamente dependiente del pH con valores altos de pH, lo que incrementa significativamente su capacidad; esto se ha atribuido a la desprotonación de los grupos hidroxil presentes en los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos (Tagliazucchi *et al.*, 2010). De este modo el ensayo de FRAP (pH 3.6) podría ser más apropiado para evaluar la capacidad antioxidante en muestras gástricas, y la prueba de ABTS (pH neutro) podría ser más apropiado para evaluar muestras intestinales (tanto de intestino delgado como extractos de fermentación colónica *in vitro*) con un pH=7 (Kamiloglu y Capanoglu, 2014).

El ácido gálico presenta una significativa correlación con los fenoles totales (Cuadro 11); siendo el ácido fenólico mayoritario en frijol común cocido antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, mostrando una alta contribución en la capacidad antioxidante (ABTS) de la muestra a lo largo de la digestión (Cuadro 11).

6.2.3 Metabolitos de compuestos fenólicos en el extracto de fermentación colónica (EF).

Se ha reportado que el frijol común presenta una alta cantidad de taninos condensados o proantocianidinas (PA), que incluyen taninos solubles e insolubles (Gu *et al.*, 2004; USDA, 2004; Serrano *et al.*, 2009). Díaz *et al.* (2010) informaron que los principales monómeros que componen a los taninos condensados en diversas variedades de frijol común son catequina (60.3%), galocatequina (25%) y afzelequina (14.7%). Cuando las PA son consumidas no son absorbidas ni degradadas en monómeros durante su tránsito a través del estómago, sino que

llegan al colon prácticamente sin alteraciones (Arts y Hollman, 2005; Manach *et al.*, 2005). En el colon son metabolizadas por la microbiota asociada a varios ácidos fenólicos, tales como los derivados de los ácidos hidroxifenilacético, hidroxifenilpropiónico, benzóico, entre otros (Déprez *et al.*, 2000; Larrosa *et al.*, 2009).

En el Cuadro 12 se muestran las concentraciones de los metabolitos de fermentación colónica de los CF, en extractos de fermentación de 2, 6, 12 y 24 horas; los cuales presentaron dos compuestos que han sido reportados como metabolitos de fermentación colónica de las proantocianidinas (Monagas *et al.*, 2009). El ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) se encontró en los cuatro extractos, siendo su concentración menor a las 2 h, y no presentado diferencia significativa en los extractos de 6, 12 y 24 h. Mientras que el ácido 3,4-dihidroxihidrocínámico (3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico, DHCA) no fue detectado a las 2 h, sino que se presentó en horas posteriores, donde mantuvo su concentración (Cuadro 12). Se ha demostrado la presencia de DOPAC y DHPA en extractos de fermentación colónica de otros alimentos y compuestos; para DOPAC se ha reportado en la fermentación colónica de arándanos (Jakešević *et al.*, 2011), de jugo de uva (Stalmach *et al.*, 2013), de rutina (Rechner *et al.*, 2004), de quercetina (Aura *et al.*, 2002); y para DHCA en la fermentación de jugo de uva (Stalmach *et al.*, 2013) y de ácido clorogénico (Rechner *et al.*, 2004).

Cuadro 12. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) de metabolitos de compuestos fenólicos en extractos de fermentación colónica *in vitro* mediante HPLC-DAD.

| TRATAMIENTO | Ác. 3,4-dihidroxifenilacético | Ác. 3,4-dihidroxihidrocínámico |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 2 h | 206.30 \pm 6.42 ^b | <LD |
| EF | 6 h | 309.19 \pm 12.17 ^a |
| | 12 h | 313.73 \pm 10.44 ^a |
| | 24 h | 303.40 \pm 10.22 ^a |

EF: extracto de fermentación; h: horas; E: equivalentes; <LD: menor al límite de detección. Media \pm ES (n=3). Letras diferentes por grupo indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Por otra parte, en el Cuadro 13 se muestra el pH durante la fermentación colónica *in vitro* de varias muestras. Se puede observar que los valores de pH disminuyen tanto para los controles positivos (rafinosa, ác. clorogénico) como para la FND del frijol común cocido. El pH del control negativo sólo presentó cambios ligeros en el pH, mostrando no diferencias significativas entre el inicio (0 h) y final de la fermentación (24 h). La FND tuvo los valores más bajos de pH durante la fermentación colónica (Cuadro 13). Comparando estos resultados, puede sugerirse que la microbiota está actuando sobre las muestras que presentan sustratos fermentables, produciendo acidificación en el medio por los metabolitos que va liberando (Campos-Vega *et al.*, 2009).

Cuadro 13. Medición del pH en el medio de incubación durante la fermentación colónica *in vitro*.

| Muestra | pH | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0 h | 2 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| Ác. clorogénico | 6.71 ± 0.02 ^{Ca} | 6.54 ± 0.02 ^{Bb} | 6.27 ± 0.05 ^{Bc} | 6.24 ± 0.04 ^{Bc} | 5.86 ± 0.01 ^{Bd} |
| Rafinosa | 7.40 ± 0.02 ^{Aa} | ND | 4.75 ± 0.02 ^{Cb} | ND | 4.13 ± 0.04 ^{Cc} |
| FND | 6.35 ± 0.01 ^{Da} | 5.98 ± 0.02 ^{Cb} | 4.17 ± 0.04 ^{Dc} | 3.66 ± 0.01 ^{Cd} | 3.45 ± 0.03 ^{De} |
| Control (-) | 7.30 ± 0.02 ^{Ba} | 6.99 ± 0.02 ^{Ac} | 6.75 ± 0.01 ^{Ad} | 7.06 ± 0.04 ^{Abc} | 7.21 ± 0.01 ^{Aab} |

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con dos réplicas ± error estándar. FND: fracción no digerible; ND: no determinado. Letras mayúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa entre las diferentes muestras bajo las mismas condiciones ($\alpha < 0.05$) por la prueba de Tukey. Letras minúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa entre los tiempos de fermentación ($\alpha < 0.05$) por la prueba de Tukey.

6.3 Efecto de EF en el modelo de macrófagos murinos

Para el ensayo celular primero se evaluó la citotoxicidad (viabilidad celular) del extracto de fermentación de 12 h (EF 12 h) a diferentes concentraciones para usarlo como tratamiento antiinflamatorio (producción de NO). Se seleccionó el EF 12 h porque fue el extracto de fermentación que presentó mayor concentración de fenoles totales, flavonoides, taninos condensados, ácido gálico y capacidad antioxidante (ABTS).

6.3.1 Efecto del EF del frijol común cocido sobre la viabilidad celular

En el presente estudio se evaluó el efecto del EF 12 h del frijol común cocido sobre la viabilidad de las células RAW 264.7 por medio del ensayo de MTT, permitiendo evaluar la citotoxicidad de dicho extracto. En la Figura 19 se observa que las diferentes concentraciones del EF 12h en los macrófagos con y sin inducción (con y sin LPS: lipopolisacáridos), no mostraron diferencias significativas con respecto al control, presentando viabilidad celular >90%. Por lo tanto, se puede concluir que las concentraciones evaluadas del EF (10, 20, 25, 30, 40 y 50%) no mostraron efectos citotóxicos significativos sobre las células RAW 264.7.

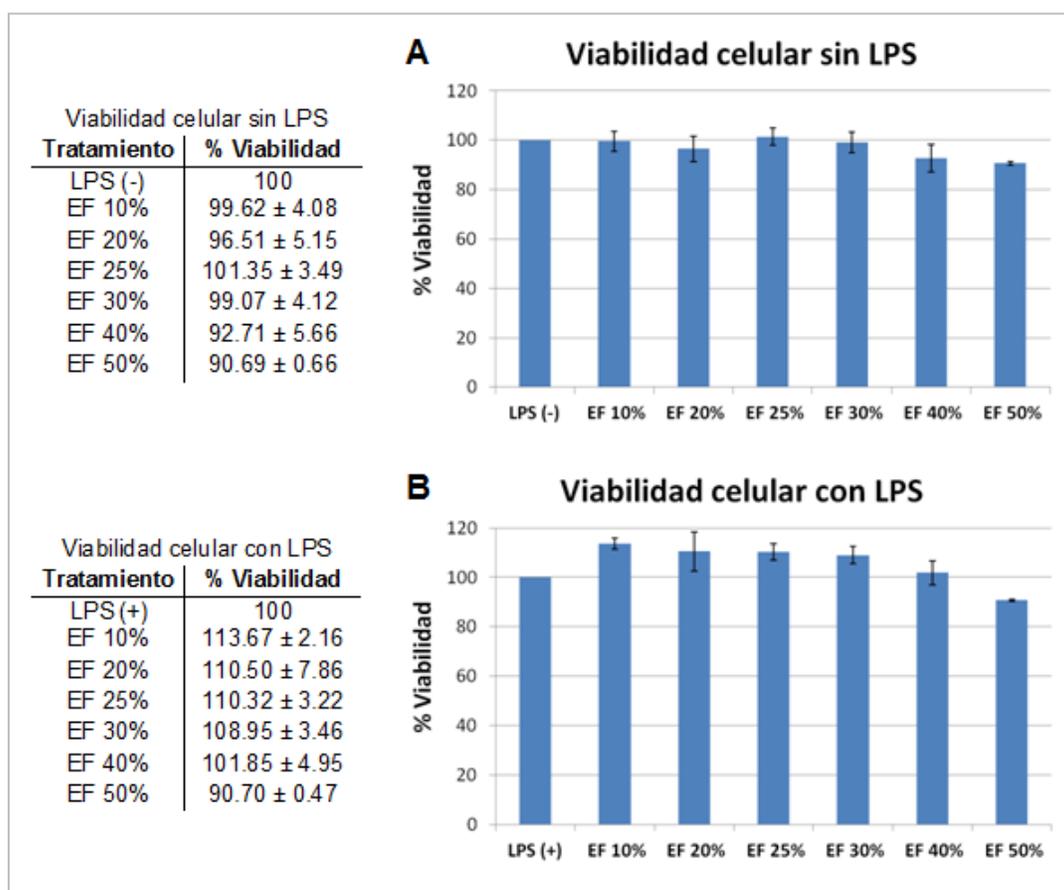


Figura 19. Efecto del EF sobre la viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7

La prueba de viabilidad celular se realizó en el medio de cultivo celular sin (A) y con LPS (B). EF: Extracto de fermentación colónica de frijol común cocido de las 12 h; LPS: lipopolisacáridos. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± error estándar.*Indica diferencia significativa en A con respecto a LPS (-) y en B con respecto LPS (+), por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Estos resultados nos permiten continuar con el siguiente ensayo, ya que al demostrarse que el extracto es seguro, se puede usar como tratamiento para disminuir la producción de óxido nítrico (NO).

6.3.2 Efecto del EF del frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos.

Cuando los macrófagos son activados expresan transcripcionalmente la isoenzima inducible iNOS, la cual es responsable de la prolongada producción de NO (Ding *et al.*, 1988; Nathan y Xie, 1994). La generación fisiológica o normal de NO media las acciones bactericidas y tumoricidas de los macrófagos; sin embargo, cuando existe una liberación aberrante de NO, se lleva a cabo el incremento de la inflamación, así como el daño al tejido (Thiemermann y Vane, 1990; Evans, 1995). Por tanto, la inhibición de la producción de NO es un blanco terapéutico importante en el desarrollo de agentes antiinflamatorios (Tsao *et al.*, 2002).

El modelo celular de macrófagos murino RAW 264.7 estimulado sólo con LPS, induce la transcripción de iNOS y la síntesis de proteína y subsecuentemente la producción de NO (Yoon *et al.*, 2009). Por tanto, este sistema celular es un excelente modelo para la evaluación de blancos importantes, como lo es el NO. Debido a la corta vida media del NO *in vivo*, se usa la producción de nitrito como biomarcador de la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Hevel y Marletta, 1994).

Para evaluar el efecto del EF de 12 h del frijol común cocido sobre la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, se usó el ensayo colorimétrico de Griess. El cual midió la acumulación de nitrito, un producto estable de NO, en el medio de cultivo. Las concentraciones que se probaron del EF de 12 h fueron del 10, 20, 25, 30, 40 y 50%.

En la Figura 20 se pueden observar los resultados obtenidos. La producción de NO disminuyó de manera dependiente de la concentración del EF de 12 h, siendo el EF 50% el que mostró una menor producción de NO; esto comparando contra la

producción de NO del control positivo LPS (+). Cabe destacar que es a partir del EF 20% donde se presentan diferencias significativas en la producción de NO con respecto al control LPS (+). Al observar este efecto, se llevó a cabo el cálculo de la concentración media inhibitoria (IC₅₀) del NO (Figura 21).

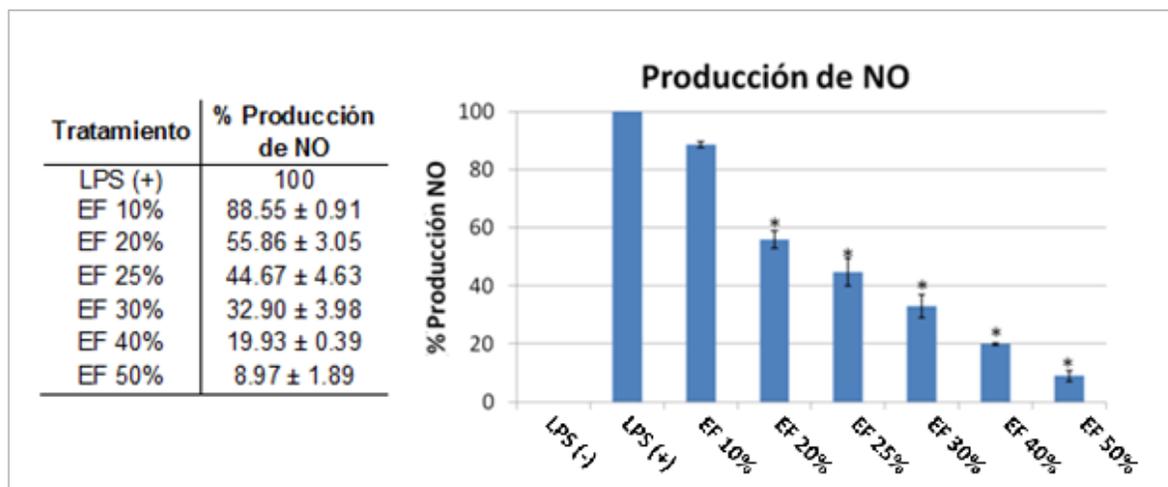


Figura 20. Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

EF: Extracto de fermentación colónica de frijol común cocido de las 12 h; LPS: lipopolisacáridos. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± error estándar. * Indica diferencia significativa con respecto al tratamiento con LPS (+) por la prueba de Dunnett (p<0.05).

La IC₅₀ del NO para el EF de 12 h fue del 21.96% (Figura 21), que corresponde a las siguientes concentraciones de CF y metabolitos de fermentación colónica de CF: 0.19 μM de ácido caféico, 0.05 μM de ácido cumárico, 0.14 μM de ácido ferúlico, 231.77 μM de ácido gálico, 25.56 μM de catequina, 27.84 μM de DOPAC y 7.50 μM de DHCA.

Sabiendo los compuestos presentes y sus concentraciones en el EF de 12 h al 21.96%, se decidió realizar un experimento cuyo tratamiento fuese la mezcla de estos compuestos puros, esto para comparar su contribución en la inhibición de la producción de NO con respecto al EF de 12 h. Los compuestos puros que se utilizaron en la mezcla para evaluar la producción fueron los siguientes: ácido gálico, catequina, DOPAC y DHCA. Esta mezcla inhibió el 59.90 ± 2.16% la producción de NO, siendo mayor su inhibición que el 21.96% de EF de 12 h. Esto puede

deberse a que el EF de 12 h, no sólo presenta compuestos fenólicos y metabolitos de los mismos, sino otros productos de fermentación colónica provenientes de fibra y proteína, los cuales pueden presentar un efecto sinérgico o antagónico en la inhibición de la producción de NO; además de que el extracto (EF 12 h) proviene de una fermentación colónica *in vitro*, donde pueden encontrarse restos fecales que puedan ocasionar algún efecto antagónico.

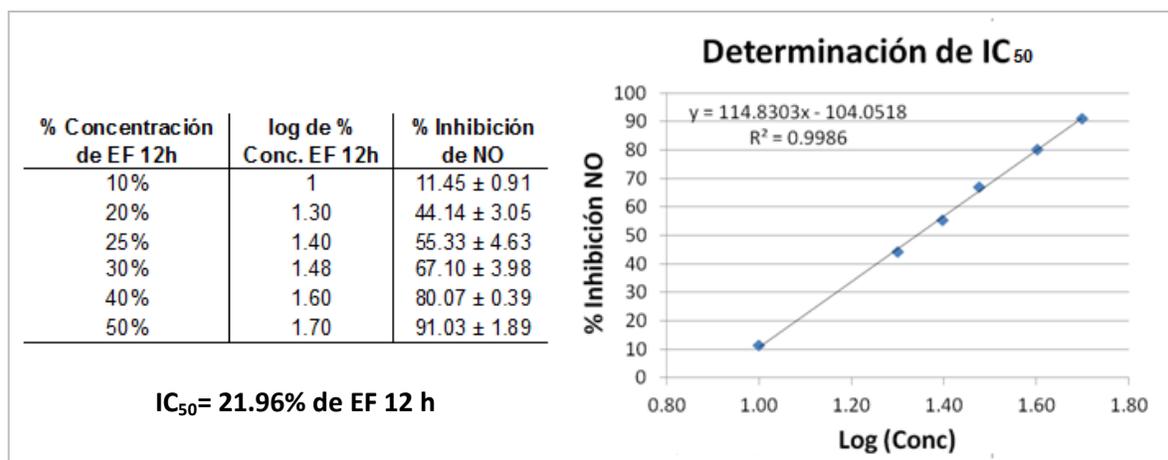


Figura 21. Concentración media inhibitoria de NO para EF 12 h en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

EF: Extracto de fermentación colónica de frijol común cocido de las 12 h; IC₅₀: concentración media inhibitoria; NO: óxido nítrico; LPS: lipopolisacáridos. Cada valor representa la media de dos análisis independientes ± error estándar.

En recientes estudios se ha reportado que los compuestos fenólicos (CF) del frijol común presentan actividad antiinflamatoria; García-Lafuente *et al.* (2014), además de encontrar una correlación entre los CF y la capacidad antioxidante de extractos del frijol común; reportan que cuando fue mayor la concentración de CF en el extracto, también fue más alta la actividad antiinflamatoria, inhibiendo la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, a través de la inhibición de la expresión de iNOS mRNA. Por otro lado, aunque en este trabajo no se realizó la medición de genes en inflamación, existe una gran evidencia de que los CF modulan la cascada inflamatoria en diferentes niveles, incluyendo la expresión de genes que codifican interleucinas (García-Lafuente *et al.*, 2009).

García-Lafuente *et al.* (2014) también muestran en su trabajo de investigación que los extractos de frijol común inhiben la expresión de genes IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Otros estudios también reportan la actividad antiinflamatoria de los CF, como Jang *et al.* (2013) que estudiaron las hojas de guayaba, cuyos extractos fenólicos disminuyeron significativamente la producción de NO de manera dosis-dependiente en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Siendo la concentración del extracto de hoja de guayaba de 30 $\mu\text{g/mL}$, inhibió el 52.58% de la producción de NO. En este estudio, el total de compuestos fenólicos presentes en los extractos correlaciono positivamente con el efecto inhibitorio del NO ($r=0.841$). Los CF mayoritarios en los extractos de hoja de guayaba fueron ácido gálico y catequina, los cuales también fueron los mayoritarios en los EF de 12 h (Cuadro 9).

También se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de metabolitos de fermentación colónica de los CF. Por ejemplo, Monagas *et al.* (2009) reportaron que los ácidos fenólicos dihidroxilados, como el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y 3,4-dihidroxifenilpropiónico, provenientes del metabolismo de proantocianidinas por la microbiota asociada, tuvieron propiedades antiinflamatorias, reduciendo significativamente la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL- β e IL-6) en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS. Además, en trabajos realizados por Larrosa *et al.* (2009) informaron que los ácidos fenólicos dihidroxilados, tales como DOPAC y ácido hidrocaféico (DHCA), proveen la mejor inhibición de la producción de prostaglandina E₂ en células de cáncer de fibroblastos (CCD-18) estimuladas con IL- β .

VII. CONCLUSIONES

El frijol común (*P. vulgaris* L.) variedad Bayo Madero presentó diferencia en la liberación de compuestos fenólicos (CF) a través de la digestión enzimática y fermentación colónica *in vitro*. La mayor liberación de CF (fenoles totales, flavonoides, taninos condensados, ácido gálico) y la más alta capacidad antioxidante (ABTS) se obtuvo durante la fermentación colónica *in vitro*; siendo el extracto de fermentación colónica de 12 h (EF 12h), el que presentó una mayor concentración de CF y la más alta capacidad antioxidante (ABTS). Se presentaron correlaciones >0.8919 entre la capacidad antioxidante (ABTS) y los CF bioaccesibles (fenoles totales, flavonoides, taninos condensados, ácido gálico) para cada etapa de la digestión enzimática y fermentación colónica *in vitro*. Alrededor del 30 al 40% del total de CF bioaccesibles en intestino delgado fueron absorbidos, sin detectar absorción de taninos condensados. Los EF presentaron metabolitos de la fermentación colónica de proantocianidinas que han sido asociados a diversas actividades biológicas: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 3,4-dihidrohidrocínámico (DHCA). El EF de 12h también mostró actividad antiinflamatoria al reducir la producción de NO de manera dosis-dependiente en macrófagos estimulados con LPS, donde el IC_{50} fue del 21.96%; que corresponde a 0.19 μ M de ác. caféico, 0.05 μ M de ác. cumárico, 0.14 μ M de ác. ferúlico, 231.77 μ M de ác. gálico, 25.56 μ M de catequina, 27.84 μ M de 3,4-DOPAC y 7.50 μ M de DHCA.

Estos resultados sugieren que las propiedades biológicas asociadas a los CF de frijol común cocido, como capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria, se ejercen principalmente en el colon. Debido a que la mayor parte de los CF del frijol común permanecen en la matriz alimentaria hasta llegar a la fermentación colónica, donde son liberados y biotransformados por la microbiota asociada; resultando en un incremento de compuestos fenólicos bioaccesibles y en la formación de metabolitos de compuestos fenólicos con propiedades biológicas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. K., A. H. H. Lichtman, y S. Pillai. 2012. Inmunología celular y molecular (6a ed.). Elsevier España.

Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593–623.

Aguilera, Y., I. Estrella, V. Benitez, R. M. Esteban, and M. A. Martín-Cabrejas. 2011. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Res. Int.* 44:774–780.

Akillioglu, H. G., and S. Karakaya. 2010. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Sci. Biotechnol.* 19:633–639.

de Almeida Costa, G. E., K. da Silva Queiroz-Monici, S. M. Pissini Machado Reis, and A. C. de Oliveira. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* 94:327–330.

Amir, Y., Haenni A.L., and Youyou A. 2006. Differences in The Biochemical Composition of Dry Legumes Cultivated in North Algeria. *Electron J Env. Agric Food Chem* 5:1411–1418.

AOAC. 2002. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 17 th ed. AOAC, Arlington.

Aparicio-Fernández, X., T. García-Gasca, G. G. Yousef, M. A. Lila, E. González de Mejía, and G. Loarca-Pina. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *J. Agric. Food Chem.* 54:2116–2122.

Aparicio-Fernández, X., L. Manzo-Bonilla, and G. F. Loarca-Piña. 2005. Comparison of Antimutagenic Activity of Phenolic Compounds in Newly Harvested and Stored Common Beans *Phaseolus vulgaris* against Aflatoxin B1. *J. Food Sci.* 70:S73–S78.

Aparicio-Fernandez, X., G. G. Yousef, G. Loarca-Pina, E. de Mejía, and M. A. Lila. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53:4615–4622.

Appeldoorn, M. M., J.-P. Vincken, A.-M. Aura, P. C. H. Hollman, and H. Gruppen. 2009a. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 57:1084–1092.

Appeldoorn, M. M., J.-P. Vincken, H. Gruppen, and P. C. H. Hollman. 2009b. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J. Nutr.* 139:1469–1473.

Arts, I. C. W., and P. C. H. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:317S–325S.

Augustin, J., C. B. Beck, G. Kalbfleish, L. C. Kagel, and R. H. Matthews. 1981. Variation in the Vitamin and Mineral Content of Raw and Cooked Commercial *Phaseolus vulgaris* Classes. *J. Food Sci.* 46:1701–1706.

Aura, A.-M., P. Martin-Lopez, K. A. O’Leary, G. Williamson, K.-M. Oksman-Caldentey, K. Poutanen, and C. Santos-Buelga. 2005. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* 44:133–142.

Aura, A.-M., K. A. O’Leary, G. Williamson, M. Ojala, M. Bailey, R. Puupponen-Pimiä, A. M. Nuutila, K.-M. Oksman-Caldentey, and K. Poutanen. 2002. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50:1725–1730.

Baardseth, P., F. Bjerke, B. K. Martinsen, and G. Skrede. 2010. Vitamin C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. *J. Sci. Food Agric.* 90:1245–1255.

Bagchi, D., C. Kuszynski, J. Balmoori, M. Bagchi, and S. J. Stohs. 1998. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother. Res.* 12:568–571.

Barahona, R., C. E. Lascano, R. Cochran, J. Morrill, and E. C. Titgemeyer. 1997. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. *J. Anim. Sci.* 75:1633–1640.

Bednar, G. E., A. R. Patil, S. M. Murray, C. M. Grieshop, N. R. Merchen, and G. C. Fahey. 2001. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *J. Nutr.* 131:276–286.

Beninger, C. W., and G. L. Hosfield. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51:7879–7883.

Beninger, C. W., G. L. Hosfield, and M. G. Nair. 1998. Flavonol Glycosides from the Seed Coat of a New Manteca-Type Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46:2906–2910.

Benveniste, P. 1986. Sterol Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:275–308.

Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70–76.

Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299:15–27.

Borges, G., M. E. J. Lean, S. A. Roberts, and A. Crozier. 2013. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food Funct.* 4:754–762.

Bosscher, D., A. Breynaert, L. Pieters, and N. Hermans. 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60 Suppl 6:5–11.

Bouayed, J., H. Deußler, L. Hoffmann, and T. Bohn. 2012. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chem.* 131:1466–1472.

Bressani, R. 1993. Grain quality of common beans. *Food Rev. Int.* 9:237–297.

Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252:55–128.

Brune, M., L. Rossander, and L. Hallberg. 1989. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43:547–557.

Cabannes, J. A. 1953. Le pH ponde´re´ et ses possibilite´s (Weighed pH and its possibilities). *Chim. Anal.* 35.

Cabrera, A., and A. Martin. 1989. Genetics of tannin content and its relationship with flower and testa colours in *Vicia faba*. *J. Agric. Sci.* 113:93–98.

Cabrera, C., F. Lloris, R. Giménez, M. Olalla, and M. C. López. 2003. Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *Sci. Total Environ.* 308:1–14.

Campos-Vega, R., T. García-Gasca, R. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, B. D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2012. Human gut flora-fermented nondigestible fraction from cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) modifies protein expression associated with apoptosis, cell cycle arrest, and proliferation in human adenocarcinoma colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 60:12443–12450.

Campos-Vega, R., G. Loarca-Piña, and B. D. Oomah. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res. Int.* 43:461–482.

Campos-Vega, R., R. Reynoso-Camacho, G. Pedraza-Aboytes, J. A. Acosta-Gallegos, S. H. Guzman-Maldonado, O. Paredes-Lopez, B. D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 74:T59–65.

Campos-Vega, R., K. Vázquez-Sánchez, D. López-Barrera, G. Loarca-Piña, S. Mendoza-Díaz, and B. D. Oomah. 2015. Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Res. Int.*

Carbonaro, M., G. Grant, M. Cappelloni, and A. Pusztai. 2000. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? *J. Agric. Food Chem.* 48:742–9.

Carbonaro, M., G. Grant, and A. Pusztai. 2001. Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur. J. Nutr.* 40:84–90.

Cardador-Martínez, A., E. Castaño-Tostado, and G. Loarca-Piña. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.* 19:62–69.

Cardador-Martínez, A., G. Loarca-Piña, and B. D. Oomah. 2002b. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–6980.

Cardona, F., C. Andrés-Lacueva, S. Tulipani, F. J. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuño. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 24:1415–1422.

Di Carlo, G., N. Mascolo, A. A. Izzo, and F. Capasso. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65:337–353.

Celada, A., and C. Nathan. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* 15:100–102.

Cerdá, B., F. A. Tomás-Barberán, and J. C. Espín. 2005. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J. Agric. Food Chem.* 53:227–235.

Chang, W.-W., C.-Y. Yu, T.-W. Lin, P.-H. Wang, and Y.-C. Tsai. 2006. Soyasaponin I decreases the expression of alpha2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:614–619.

- Cheeke, P. R. 1989. Toxicants of Plant Origin: Glycosides. CRC Press.
- Choung, M.-G., B.-R. Choi, Y.-N. An, Y.-H. Chu, and Y.-S. Cho. 2003. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food Chem. 51:7040–7043.
- Chung, H.-J., Q. Liu, K. Peter Pauls, M. Z. Fan, and R. Yada. 2008. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. Food Res. Int. 41:869–875.
- Clifford, M. N. 2004. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. Planta Med. 70:1103–1114.
- Dangles, O., G. Fargeix, and C. Dufour. 2000. Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2:1653–1663.
- Day, A. J., F. Mellon, D. Barron, G. Sarrazin, M. R. Morgan, and G. Williamson. 2001. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. Free Radic. Res. 35:941–952.
- Déprez, S., C. Brezillon, S. Rabot, C. Philippe, I. Mila, C. Lapierre, and A. Scalbert. 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. J. Nutr. 130:2733–2738.
- Déprez, S., I. Mila, J. F. Huneau, D. Tome, and A. Scalbert. 2001. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. Antioxid. Redox Signal. 3:957–967.
- Deshpande, S. S., and M. Cheryan. 1985. Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. J. Food Sci. 50:905–910.
- Deshpande, S. S., and M. Cheryan. 1987. Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox and Precipitation Assays. J. Food Sci. 52:332–334.
- Dey, P. M., and J. B. Harbone. 1989. METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY VOL 1 APL. Academic Press.
- Díaz, A. M., G. V. Caldas, and M. W. Blair. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. Food Res. Int. 43:595–601.
- Díaz-Batalla, L., J. M. Widholm, G. C. Fahey, E. Castaño-Tostado, and O. Paredes-López. 2006. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food Chem. 54:2045–2052.

Dinelli, G., A. Bonetti, M. Minelli, I. Marotti, P. Catizone, and A. Mazzanti. 2006. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chem.* 99:105–114.

Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 141:2407–2412.

Dixon, R. A., D.-Y. Xie, and S. B. Sharma. 2005. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165:9–28.

Donovan, J. L., V. Crespy, C. Manach, C. Morand, C. Besson, A. Scalbert, and C. Rémésy. 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr.* 131:1753–1757.

van Dorsten, F. A., S. Peters, G. Gross, V. Gomez-Roldan, M. Klinkenberg, R. C. de Vos, E. E. Vaughan, J. P. van Duynhoven, S. Possemiers, T. van de Wiele, and D. M. Jacobs. 2012. Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and colon-region dependent. *J. Agric. Food Chem.* 60:11331–11342.

Duggan, C., J. Gannon, and W. A. Walker. 2002. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:789–808.

Elhardallou, S. B., and A. F. Walker. 1992. Binding of iron by three starchy legumes in the presence of iron alone, with calcium or with calcium, zinc, magnesium and copper. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 43:61–68.

Elizalde, A. D. D., Y. Pismag Portilla, and D. C. Chaparro. 2009. ANTINUTRITIONAL FACTORS IN EATABLE SEEDS. *Biotechnol. En El Sect. Agropecu. Agroindustrial* 7:45–54.

Ellington, A. A., M. A. Berhow, and K. W. Singletary. 2006. Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27:298–306.

Escudero Álvarez, E., and P. González Sánchez. 2006. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* 21:61–72.

Espinosa-Alonso, L. G., A. Lygin, J. M. Widholm, M. E. Valverde, and O. Paredes-Lopez. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54:4436–4444.

Evans, C. H. 1995. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions. Suppl.* 47:107–116.

FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1995. Ictiopatología nutricional. Available from: <http://www.fao.org/docrep/003/T0700S/T0700S00.HTM>

Fenwick, D. E., and D. Oakenfull. 1983. Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.* 34:186–191.

Feregrino-Pérez, A. A., L. C. Berumen, G. García-Alcocer, R. G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, and G. Loarca-Piña. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J. Agric. Food Chem.* 56:8737–8744.

Foo, L. Y., Y. Lu, W. C. McNabb, G. Waghorn, and M. J. Ulyatt. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* 45:1689–1696.

Gao, K., A. Xu, C. Krul, K. Venema, Y. Liu, Y. Niu, J. Lu, L. Bensoussan, N. P. Seeram, D. Heber, and S. M. Henning. 2006. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 136:52–57.

García-Lafuente, A., E. Guillamón, A. Villares, M. A. Rostagno, and J. A. Martínez. 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* 58:537–552.

García-Lafuente, A., C. Moro, N. Manchón, A. Gonzalo-Ruiz, A. Villares, E. Guillamón, M. Rostagno, and L. Mateo-Vivaracho. 2014. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chem.* 161:216–223.

Glässer, G., E. U. Graefe, F. Struck, M. Veit, and R. Gebhardt. 2002. Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 9:33–40.

Golam Masu, A. S. M., L. Khandaker, J. Berthold, L. Gates, K. Peters, H. DeLong, and K. Hossain. 2011. Anthocyanin, Total Polyphenols and Antioxidant Activity of Common Bean. *Am. J. Food Technol.* 6:385–394.

González de Mejía, E., E. Castaño-Tostado, and G. Loarca-Piña. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat. Res.* 441:1–9.

González de Mejía, E., S. H. Guzmán-Maldonado, J. A. Acosta-Gallegos, R. Reynoso-Camacho, E. Ramírez-Rodríguez, J. L. Pons-Hernández, M. M. González-Chavira, J. Z. Castellanos, and J. D. Kelly. 2003. Effect of cultivar and

growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 51:5962–5966.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23–35.

Gordon, S., and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5:953–964.

Gotteland, M., M. Andrews, M. Toledo, L. Muñoz, P. Caceres, A. Anziani, E. Wittig, H. Speisky, and G. Salazar. 2008. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 24:421–426.

Graham, P. H., and P. Ranalli. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 53:131–146.

Grajales-García, E. M. 2010. Tesis: Estudio de la digestibilidad de almidón y capacidad antioxidante de una tortilla elaborada con una mezcla de maíz de alta calidad proteíca y frijol negro. IPN.

Grajek, W. 2007. Przeciwutleniacze w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne: praca zbiorowa. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.

Granfeldt, Y., I. Björck, A. Drews, and J. Tovar. 1992. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46:649–660.

Granito, M., M. Paolini, and S. Pérez. 2008. Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:994–999.

Grela, E. R., and K. D. Günter. 1995. Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 52:325–331.

Gross, G., D. M. Jacobs, S. Peters, S. Possemiers, J. van Duynhoven, E. E. Vaughan, and T. van de Wiele. 2010. In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J. Agric. Food Chem.* 58:10236–10246.

Guajardo-Flores, D., S. O. Serna-Saldívar, and J. A. Gutiérrez-Urbe. 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 141:1497–1503.

Gülçin, İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* 86:345–391.

Gu, L., M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt, and R. L. Prior. 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* 134:613–617.

Güzel, D., and S. Sayar. 2012. Effect of cooking methods on selected physicochemical and nutritional properties of barlotto bean, chickpea, faba bean, and white kidney bean. *J. Food Sci. Technol.* 49:89–95.

Guzmán-Maldonado, H., J. Castellanos, and E. G. De Mejía. 1996. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 55:333–335.

Gylling, H., and T. A. Miettinen. 2005. The effect of plant stanol- and sterol-enriched foods on lipid metabolism, serum lipids and coronary heart disease. *Ann. Clin. Biochem.* 42:254–263.

Hagerman, A. E., K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld, and T. L. Riechel. 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46:1887–1892.

Ha, M. A., M. C. Jarvis, and J. I. Mann. 2000. A definition for dietary fibre. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:861–864.

Hayat, I., A. Ahmad, T. Masud, A. Ahmed, and S. Bashir. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54:580–592.

Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13:572–584.

Hervert-Hernández, D., and I. Goñi. 2011. Dietary Polyphenols and Human Gut Microbiota: a Review. *Food Rev. Int.* 27:154–169.

Hevel, J. M., and M. A. Marletta. 1994. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* 233:250–258.

Holland, B., I. . Unwin, and D. H. Buss. 1992. First supplement to McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19801411181.html>

Hoover, R., and Y. Zhou. 2003. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes—a review. *Carbohydr. Polym.* 54:401–417.

Hou, D.-X., K. Kai, J.-J. Li, S. Lin, N. Terahara, M. Wakamatsu, M. Fujii, M. R. Young, and N. Colburn. 2004. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25:29–36.

Iqbal, A., I. A. Khalil, N. Ateeq, and M. Sayyar Khan. 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem.* 97:331–335.

Jacobs, D. M., E. Gaudier, J. van Duynhoven, and E. E. Vaughan. 2009. Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Curr. Drug Metab.* 10:41–54.

Jakesevic, M., K. Aaby, G.-I. A. Borge, B. Jeppsson, S. Ahrné, and G. Molin. 2011. Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and *Lactobacillus plantarum* HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion. *BMC Complement. Altern. Med.* 11:8.

Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik, C. A. J. Jr, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik. 2001. *Immunobiology*. 5th ed. Garland Science.

Jang, M., S.-W. Jeong, S. K. Cho, K.-S. Ahn, B.-K. Kim, and J.-C. Kim. 2013. Anti-inflammatory effects of 4 medicinal plant extracts in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Food Sci. Biotechnol.* 22:213–220.

Jati, I. R. A. P., V. Vadivel, and H. K. Biesalski. 2013. Chapter 31 - Antioxidant Activity of Anthocyanins in Common Legume Grains. In: R. R. W. R. Preedy, editor. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*. Academic Press, San Diego. p. 485–497.

Jenkins. 2007. *The Glycemic Index: Looking Back 25 Years*. Cereal Foods World. Available from: <http://www.aaccnet.org/publications/plexus/cfw/pastissues/2007/abstracts/CFW-52-2-0050.html>

Jood, S., B. M. Chauhan, and A. C. Kapoor. 1988. Contents and digestibility of carbohydrates of chickpea and black gram as affected by domestic processing and cooking. *Food Chem.* 30:113–127.

Joo, T., K. Sowndhararajan, S. Hong, J. Lee, S.-Y. Park, S. Kim, and J.-W. Jhoo. 2014. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi J. Biol. Sci.* 21:427–435.

Kamiloglu, S., and E. Capanoglu. 2014. In vitro gastrointestinal digestion of polyphenols from different molasses (pekmez) and leather (pestil) varieties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49:1027–1039.

Kantar, F., P. D. Hebblethwaite, and C. J. Pilbeam. 1996. Factors influencing disease resistance in high and low tannin *Vicia faba*. *J. Agric. Sci.* 127:83–88.

- Karlsson, P. C., U. Huss, A. Jenner, B. Halliwell, L. Bohlin, and J. J. Rafter. 2005. Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. *J. Nutr.* 135:2343–2349.
- Katsube, N., K. Iwashita, T. Tsushida, K. Yamaki, and M. Kobori. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 51:68–75.
- Khokhar, S., and B. M. Chauhan. 1986. Antinutritional factors in Moth Bean (*Vigna aconitifolia*): Varietal Differences and Effects of Methods of Domestic Processing and Cooking. *J. Food Sci.* 51:591–594.
- Kondo, H., S.-H. Park, K. Watanabe, Y. Yamamoto, and M. Akashi. 2004. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits apoptosis induced by irradiation in human HaCaT keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:59–64.
- Kutoš, T., T. Golob, M. Kač, and A. Plestenjak. 2003. Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chem.* 80:231–235.
- Kutschera, M., W. Engst, M. Blaut, and A. Braune. 2011. Isolation of catechin-converting human intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 111:165–175.
- Laparra, J. M., and Y. Sanz. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 61:219–225.
- Larrosa, M., M. T. García-Conesa, J. C. Espín, and F. A. Tomás-Barberán. 2010. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* 31:513–539.
- Larrosa, M., C. Luceri, E. Vivoli, C. Pagliuca, M. Lodovici, G. Moneti, and P. Dolara. 2009. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:1044–1054.
- Lazzè, M. C., M. Savio, R. Pizzala, O. Cazzalini, P. Perucca, A. I. Scovassi, L. A. Stivala, and L. Bianchi. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25:1427–1433.
- Lee, H. C., A. M. Jenner, C. S. Low, and Y. K. Lee. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157:876–884.
- Leterme, P., and L. Carmenza Muñoz. 2002. Factors influencing pulse consumption in Latin America. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 3:S251–255.
- Lin, L.-Z., J. M. Harnly, M. S. Pastor-Corrales, and D. L. Luthria. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 107:399–410.

- Liu, B., W. Li, L. Hu, and J. Zhao. 2013. Mild Alkaline Hydrolysis Is an Efficient and Low-Cost Method for Improving the Free Phenolic Content and Health Benefit of Pomegranate Peel Extract. *J. Food Process. Preserv.* 37:694–700.
- Li, Y.-G., G. Tanner, and P. Larkin. 1996. The DMACA–HCl Protocol and the Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *J. Sci. Food Agric.* 70:89–101.
- Luna Vital, D. A., E. González de Mejía, V. P. Dia, and G. Loarca-Piña. 2014. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chem.* 157:347–355.
- Luthria, D. L., and M. A. Pastor-Corrales. 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food Compos. Anal.* 19:205–211.
- Mabaleha, M. B., and S. O. Yeboah. 2004. Characterization and compositional studies of the oils from some legume cultivars, *Phaseolus vulgaris*, grown in Southern Africa. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81:361–364.
- Ma, B.-L., M.-K. Yao, J. Zhong, Y.-M. Ma, C.-L. Gao, J.-S. Wu, F.-R. Qiu, C.-H. Wang, and X.-H. Wang. 2012. Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40:381–388.
- MacDonald, R. S., J. Guo, J. Copeland, J. D. Browning, D. Sleper, G. E. Rottinghaus, and M. A. Berhow. 2005. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J. Nutr.* 135:1239–1242.
- MacMicking, J., Q. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:323–350.
- Macz-Pop, G. A., A. M. González-Paramás, J. J. Pérez-Alonso, and J. C. Rivas-Gonzalo. 2006. New flavanol-anthocyanin condensed pigments and anthocyanin composition in guatemalan beans (*Phaseolus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 54:536–542.
- Makkar, H. P. S., G. Gamble, and K. Becker. 1999. Limitation of the butanol–hydrochloric acid–iron assay for bound condensed tannins. *Food Chem.* 66:129–133.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:727–747.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:230S–242S.

- Mandalari, G., C. Bisignano, M. D'Arrigo, G. Ginestra, A. Arena, A. Tomaino, and M. S. J. Wickham. 2010. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:83–89.
- Mandalari, G., R. M. Faulks, C. Bisignano, K. W. Waldron, A. Narbad, and M. S. J. Wickham. 2010. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS Microbiol. Lett.* 304:116–122.
- Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37:14–16.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23:549–555.
- Marathe, S. A., V. Rajalakshmi, S. N. Jamdar, and A. Sharma. 2011. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49:2005–2012.
- Marles, M. A. S., H. Ray, and M. Y. Gruber. 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* 64:367–383.
- Marquardt, K. C., and R. R. Watson. 2014. Chapter 2 - Polyphenols and Public Health. In: R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, editors. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press, San Diego. p. 9–15.
- Marzo, F., R. Alonso, E. Urdaneta, F. J. Arricibita, and F. Ibáñez. 2002. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *J. Anim. Sci.* 80:875–879.
- McDonald, M., I. Mila, and A. Scalbert. 1996. Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 44:599–606.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–435.
- Monagas, M., N. Khan, C. Andrés-Lacueva, M. Urpí-Sardá, M. Vázquez-Agell, R. M. Lamuela-Raventós, and R. Estruch. 2009. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Nutr.* 102:201–206.
- Monagas, M., M. Urpí-Sarda, F. Sánchez-Patán, R. Llorach, I. Garrido, C. Gómez-Cordovés, C. Andres-Lacueva, and B. Bartolomé. 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 1:233–253.

Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109–142.

Mosele, J. I., A. Macià, M.-P. Romero, M.-J. Motilva, and L. Rubió. 2015. Application of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *J. Funct. Foods* 14:529–540.

Mytar, B., M. Siedlar, M. Wołoszyn, I. Ruggiero, J. Pryjma, and M. Zembala. 1999. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br. J. Cancer* 79:737–743.

Naczek, M., D. Oickle, D. Pink, and F. Shahidi. 1996. Protein Precipitating Capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 44:2144–2148.

Nathan, C., and Q. W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915–918.

Nilsson, J., D. Pillai, G. Önning, C. Persson, Å. Nilsson, and B. Åkesson. 2005. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazolone-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:239–246.

Ojijo, O. N. K., T. Kimura, and H. Koaze. 2000. Composition, Soaking and Softening Characteristics of Some Kenyan Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Sci. Technol. Res.* 6:12–18.

Oliveira, I., A. Sousa, J. S. Morais, I. C. F. R. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho, and J. A. Pereira. 2008. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46:1801–1807.

Oomah, B. D., A. Cardador-Martínez, and G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 85:935–942.

Papa, R., J. Acosta, A. Delgado-Salinas, and P. Gepts. 2005. A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 111:1147–1158.

Papa, R., and P. Gepts. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 106:239–250.

Parada, J., and J. M. Aguilera. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* 72:R21–32.

Paredes-Lopez, O., F. G. Lara, y L. A. B. Pérez. 2006a. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Secretaría de Educación Pública.

Paredes-López, O., y M. E. Valverde-González. 2006b. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV* 25:65–73.

Patil, A., V. Raheja, and A. Damre. 2010. Simultaneous analysis of intestinal permeability markers, caffeine, paracetamol and sulfasalazine by reverse phase liquid chromatography: A tool for the standardization of rat everted gut sac model. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 3:204.

Pellegrini, N., M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, and F. Brighenti. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133:2812–2819.

Peñalver, C., I. M. Herrera, and J. Tovar. 2007. Indigestible starch associated to dietary fiber residues from cooked legume seeds consumed in Venezuela. *Interciencia*. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932908>

Pérez-Jiménez, J., M. E. Díaz-Rubio, and F. Saura-Calixto. 2013. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr. Res. Rev.* 26:118–129.

Peris, P. G., I. B. Lesmes, y C. de la C. C. y M. C. Álv. 2002. El metabolismo colónico de la fibra. *Nutr. Hosp.* 17. Available from: <http://www.aulamedica.es/gdcr/index.php/nh/article/view/3360>

Plowden, J., M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman, J. Katz, and S. Sambhara. 2004. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3:161–167.

Price, K. R., I. T. Johnson, and G. R. Fenwick. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26:27–135.

Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53:4290–4302.

Puig-Kröger, A., E. Sierra-Filardi, A. Domínguez-Soto, R. Samaniego, M. T. Corcuera, F. Gómez-Aguado, M. Ratnam, P. Sánchez-Mateos, and A. L. Corbí. 2009. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 69:9395–9403.

Queipo-Ortuño, M. I., M. Boto-Ordóñez, M. Murri, J. M. Gomez-Zumaquero, M. Clemente-Postigo, R. Estruch, F. Cardona Diaz, C. Andrés-Lacueva, and F. J.

Tinahones. 2012. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* 95:1323–1334.

Rafi, M. M., B. C. Vastano, N. Zhu, C.-T. Ho, G. Ghai, R. T. Rosen, M. A. Gallo, and R. S. DiPaola. 2002. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 50:677–684.

Ralph, P., and I. Nakoinz. 1977. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 119:950–954.

Ramírez-Jiménez, A. K., R. Reynoso-Camacho, S. Mendoza-Díaz, and G. Loarca-Piña. 2014. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chem.* 161:254–260.

Rasmussen, S. E., H. Frederiksen, K. Struntze Krogholm, and L. Poulsen. 2005. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:159–174.

Rechner, A. R., and C. Kroner. 2005. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb. Res.* 116:327–334.

Rechner, A. R., G. Kuhnle, P. Bremner, G. P. Hubbard, K. P. Moore, and C. A. Rice-Evans. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 33:220–235.

Rechner, A. R., M. A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, S. K. S. Srail, K. P. Moore, and C. A. Rice-Evans. 2004. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 36:212–225.

Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1985. Dry bean tannins: A review of nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62:541–549.

Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516–1528.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activitand applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231–1237.

Restrepo-Sánchez, D.-C., C.-E. Narváez-Cuenca, and L.-P. Restrepo-Sánchez. 2009. Extraction of compounds with antioxidant activity in guava (*Psidium guajava* L.) fruit produced in Vélez-Santander, Colombia. *Quím. Nova* 32:1517–1522.

Reyes-Martínez, A., N. Almaraz-Abarca, T. Gallardo-Velázquez, M. D. S. González-Elizondo, Y. Herrera-Arrieta, A. Pajarito-Ravelero, R. E. Alanís-

Bañuelos, and M. I. Torres-Morán. 2014. Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers. *Nat. Prod. Res.* 28:2158–2162.

Reynoso-Camacho, R., M. Ramos-Gomez, y G. Loarca-Pina. 2006. Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). :217–236.

Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152–159.

Rice-Evans, C., and L. Packer. 1998. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker.

Roberfroid, M. B. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am. J. Clin. Nutr.* 73:406S–409S.

Rochfort, S., and J. Panozzo. 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J. Agric. Food Chem.* 55:7981–7994.

Romani, A., P. Vignolini, C. Galardi, N. Mulinacci, S. Benedettelli, and D. Heimler. 2004. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J. Agric. Food Chem.* 52:3838–3842.

Ruangnoo, S., N. Jaiaree, S. Makchuchit, S. Panthong, P. Thongdeeying, and A. Itharat. 2012. An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. *Asian Pac. J. Allergy Immunol. Launched Allergy Immunol. Soc. Thailand.* 30:268–274.

Russell, W. R., J. E. Drew, L. Scobbie, and G. G. Duthie. 2006. Inhibition of cytokine-induced prostanoid biogenesis by phytochemicals in human colonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1762:124–130.

Ryan, E., K. Galvin, T. P. O'Connor, A. R. Maguire, and N. M. O'Brien. 2007. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 62:85–91.

Sai-Ut, S., S. Ketnawa, P. Chaiwut, and S. Rawdkuen. 2009. Biochemical and functional properties of proteins from red kidney, navy and adzuki beans. *Asian J. Food Agro-Ind.* 2:493–504.

Saura-Calixto, F. D., and I. Goñi. 2004. The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58:1078–1082.

Saura-Calixto, F., A. García-Alonso, I. Goñi, and L. Bravo. 2000. In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J. Agric. Food Chem.* 48:3342–3347.

Saura-Calixto, F., J. Pérez-Jiménez, S. Touriño, J. Serrano, E. Fuguet, J. L. Torres, and I. Goñi. 2010. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:939–946.

Saura-Calixto, F., J. Serrano, and I. Goñi. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101:492–501.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875–3883.

Scalbert, A., C. Morand, C. Manach, and C. Rémésy. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 56:276–282.

Schofield, P., D. M. Mbugua, and A. N. Pell. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:21–40.

Seena, S., K. R. Sridhar, and B. Bhagya. 2005. Biochemical and biological evaluation of an unconventional legume, *canavalia maritima* of coastal sand dunes of India. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93950101>

Seeram, N. P., L. S. Adams, M. L. Hardy, and D. Heber. 2004. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 52:2512–2517.

Selma, M. V., J. C. Espín, and F. A. Tomás-Barberán. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J. Agric. Food Chem.* 57:6485–6501.

Serrano, J., I. Goñi, and F. Saura-Calixto. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* 40:15–21.

Serrano, J., R. Puupponen-Pimiä, A. Daur, A.-M. Aura, and F. Saura-Calixto. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 Suppl 2:S310–329.

Shafiee, M., M.-A. Carbonneau, J.-B. d'Huart, B. Descomps, and C. L. Léger. 2002. Synergistic antioxidative properties of phenolics from natural origin toward low-density lipoproteins depend on the oxidation system. *J. Med. Food* 5:69–78.

Sheu, F., H. H. Lai, and G. C. Yen. 2001. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 49:1767–1772.

Shi, J., K. Arunasalam, D. Yeung, Y. Kakuda, G. Mittal, and Y. Jiang. 2004. Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *J. Med. Food* 7:67–78.

Shimelis, E. A., and S. K. Rakshit. 2005. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *LWT - Food Sci. Technol.* 38:331–338.

Siddiq, M., R. Ravi, J. B. Harte, and K. D. Dolan. 2010. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT - Food Sci. Technol.* 43:232–237.

Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 299C:152–178.

Słupski, J. 2010. Effect of cooking and sterilisation on the composition of amino acids in immature seeds of flageolet bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Food Chem.* 121:1171–1176.

da S Queiroz-Monici, K., G. E. A. Costa, N. da Silva, S. M. P. M. Reis, and A. C. de Oliveira. 2005. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 21:602–608.

Stalmach, A., C. A. Edwards, J. D. Wightman, and A. Crozier. 2013. Colonic catabolism of dietary phenolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice. *Food Funct.* 4:52–62.

Steer, T. E., I. T. Johnson, J. M. Gee, and G. R. Gibson. 2003. Metabolism of the soybean isoflavone glycoside genistin in vitro by human gut bacteria and the effect of prebiotics. *Br. J. Nutr.* 90:635–642.

Stein, K., A. Borowicki, D. Scharlau, K. Scheu, G. Brenner-Weiss, U. Obst, J. Hollmann, M. Lindhauer, N. Wachter, and M. Glei. 2011. Modification of an in vitro model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. *Br. J. Nutr.* 105:678–687.

Stoupi, S., G. Williamson, J. W. Drynan, D. Barron, and M. N. Clifford. 2010. A comparison of the in vitro biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:747–759.

Stuehr, D. J., and C. F. Nathan. 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169:1543–1555.

Sun, B., J. M. Ricardo-da-Silva, and I. Spranger. 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46:4267–4274.

Tagliacruzchi, D., E. Verzelloni, D. Bertolini, and A. Conte. 2010. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 120:599–606.

Takeoka, G. R., L. T. Dao, G. H. Full, R. Y. Wong, L. A. Harden, R. H. Edwards, and J. D. J. Berrios. 1997. Characterization of Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:3395–3400.

Tang, C.-H., and X. Sun. 2011. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (*Phaseolus angularis*) with different polypeptide constituents. *Food Hydrocoll.* 25:536–544.

Tarko, T., A. Duda-Chodak, and N. Zajac. 2013. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz. Państw. Zakładu Hig.* 64:79–84.

Terrill, T. H., A. M. Rowan, G. B. Douglas, and T. N. Barry. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321–329.

Terzić, J., S. Grivennikov, E. Karin, and M. Karin. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138:2101–2114.e5.

Thewles, A., R. A. Parslow, and R. Coleman. 1993. Effect of diosgenin on biliary cholesterol transport in the rat. *Biochem. J.* 291:793–798.

Thiemermann, C., and J. Vane. 1990. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 182:591–595.

Thompson, G. R., and S. M. Grundy. 2005. History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *Am. J. Cardiol.* 96:3D–9D.

Treviño-Mejía, D. 2013. Tesis: Desarrollo y evaluación nutrimental y nutracéutica de tortillas a base de harina de maíz nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Available from: UAQ

Tsao, L.-T., C.-Y. Lee, L.-J. Huang, S.-C. Kuo, and J.-P. Wang. 2002. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by a synthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochem. Pharmacol.* 63:1961–1968.

Tsuda, T., T. Osawa, K. Ohshima, and S. Kawakishi. 1994. Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.* 42:248–251.

Tzounis, X., A. Rodriguez-Mateos, J. Vulevic, G. R. Gibson, C. Kwik-Urbe, and J. P. E. Spencer. 2011. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy

humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 93:62–72.

Urpi-Sarda, M., I. Garrido, M. Monagas, C. Gómez-Cordovés, A. Medina-Remón, C. Andres-Lacueva, and B. Bartolomé. 2009. Profile of plasma and urine metabolites after the intake of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] polyphenols in humans. *J. Agric. Food Chem.* 57:10134–10142.

USDA. 2004. Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods. USDA.

Vadivel, V., and K. Janardhanan. 2000. Nutritional and anti-nutritional composition of velvet bean: an under-utilized food legume in south India. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51:279–287.

Valenzuela B, A., y A. Maiz G. 2006. EL ROL DE LA FIBRA DIETÉTICA EN LA NUTRICION ENTERAL. *Rev. Chil. Nutr.* 33:342–311.

Vallejo, F., A. Gil-Izquierdo, A. Pérez-Vicente, and C. García-Viguera. 2004. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* 52:135–138.

Vergara-Castañeda, H. A., R. G. Guevara-González, M. Ramos-Gómez, R. Reynoso-Camacho, H. Guzmán-Maldonado, A. A. Feregrino-Pérez, B. D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food Funct.* 1:294–300.

Vergara-Castañeda Haydé, Guevara-González Ramón, Guevara-Olvera Lorenzo, Oomah B. Dave, Reynoso-Camacho Rosalía, Wiersma Paul, and Loarca-Piña Guadalupe. 2012. Non-digestible fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates signalling pathway genes at an early stage of colon cancer in Sprague-Dawley rats. *Br. J. Nutr.* 108 Suppl 1:S145–154.

Vermerris, W., and R. Nicholson. 2008. Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht, Springer. <http://www.springer.com/us/book/9781402051630>

Vitali, B., M. Ndagijimana, F. Cruciani, P. Carnevali, M. Candela, M. E. Guerzoni, and P. Brigidi. 2010. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiol.* 10:4.

Walle, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36:829–837.

Weihrauch, J. L., and J. M. Gardner. 1978. Sterol content of foods of plant origin. *J. Am. Diet. Assoc.* 73:39–47.

Weiss, U. 2008. Inflammation. *Nature* 454:427–427.

- Welch, R. M., W. A. House, S. Beebe, and Z. Cheng. 2000. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 48:3576–3580.
- Williamson, G., A. J. Day, G. W. Plumb, and D. Couteau. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.* 28:16–22.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126:485–493.
- Wu, X., G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, and R. L. Prior. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52:4026–4037.
- Wu, X. J., R. James, and A. K. Anderson. 2005. Mineral Contents in Seed Coat and Canning Quality of Selected Cultivars of Dark Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Process. Preserv.* 29:63–74.
- Xuan, L., L. Liu, H. Wasila, G. Zhongmei, Y. Tian, and Z. Beita. 2014. Variation of Polyphenols Composition and Bioactivities of Pomegranate Wines along in Vitro Digestion Process. *J. Food Nutr. Res.* 2:839–845.
- Xu, B., and S. K. C. Chang. 2009. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.* 57:4754–4764.
- Xu, B. J., and S. K. C. Chang. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* 72:S159–166.
- Yen, G.-C., P.-D. Duh, D.-W. Huang, C.-L. Hsu, and T. Y.-C. Fu. 2008. Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46:175–185.
- Yoon, W.-J., Y. M. Ham, S.-S. Kim, B.-S. Yoo, J.-Y. Moon, J. S. Baik, N. H. Lee, and C.-G. Hyun. 2009. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsian J. Biosci.*:130–143.
- Yoshida, H., Y. Tomiyama, and Y. Mizushina. 2005. Characterization in the fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Lipids.* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301000502>

Youdim, K. A., A. Martin, and J. A. Joseph. 2000. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29:51–60.

Younes, H., C. Coudray, J. Bellanger, C. Demigné, Y. Rayssiguier, and C. Rémésy. 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br. J. Nutr.* 86:479–485.

Zhou, K., M. Slavin, H. Lutterodt, M. Whent, N. A. M. Eskin, and L. Yu. 2013. Chapter 1 - Cereals and Legumes. In: N. A. M. Eskin and F. Shahidi, editors. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*. Academic Press, San Diego. p. 3–48.