

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO  
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

**“Evaluación de la capacidad antiinflamatoria del extracto de fermentación de la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en macrófagos murinos”**

## TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

### **Presenta:**

LN Sandra Celada Martínez

### **Dirigido por:**

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Santiago de Querétaro, Qro., noviembre, 2017



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

**“Evaluación de la capacidad antiinflamatoria del extracto de fermentación de la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en macrófagos murinos”**

**TESIS**

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

**Presenta:**

LN Sandra Celada Martínez

**Dirigido por:**

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

**SINODALES:**

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Presidente

  
Firma

Dra. Rocio Campos Vega  
Secretario

  
Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez  
Vocal

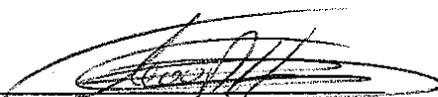
  
Firma

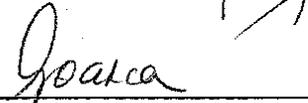
Dr. Jorge Acosta Gallegos  
Suplente

  
Firma

Dra. María de la Luz Reyes Vega  
Suplente

  
Firma

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

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

## RESUMEN

Cambios en el patrón alimentario y estilo de vida de los mexicanos han incrementado la incidencia de enfermedades no transmisibles (ENTs) como: obesidad, diabetes tipo 2, cardiovasculares y cáncer las cuales están precedidas de un estado de inflamación crónica. A la dieta se le ha relacionado con el desarrollo o inhibición de las ENTs. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), alimento tradicional del mexicano, es una importante fuente de proteínas y carbohidratos, así como de compuestos bioactivos como: compuestos fenólicos (CF) y fibra. Estos compuestos pueden interactuar con otros elementos de la matriz alimentaria y alterar su estabilidad durante la digestión, por lo que es importante conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de éstos. La fracción no digerible (FND) es la porción que resiste la digestión a través del tracto digestivo y llega al colon donde, tanto los carbohidratos como los CF pueden ser fermentados, siendo los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos fenólicos, entre otros metabolitos, los principales productos de este proceso. El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad antiinflamatoria del extracto fermentado (EF) de la FND de frijol común cocido sobre diferentes marcadores de inflamación como óxido nítrico (ON) y diferentes proteínas del proceso inflamatorio. Por lo tanto, se caracterizó el frijol común y los extractos provenientes de su digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*. Los CF se liberaron a lo largo de la digestión gastrointestinal, observándose una cantidad importante en el EF colónica de 12 h (ácido gálico, (+)-catequina, ácido caféico). Los compuestos bioaccesibles presentaron absorciones desde el 48.79 al 74.34 %. Los CF, fibra dietética y oligosacáridos que llegaron al colon fueron fermentados por la microbiota, produciendo metabolitos de CF (3,4-dihidroxifenilacético, 3-hidroxibenzoico) y AGCC (acético, propiónico y butírico). El EF de la FND de frijol mostró potencial antiinflamatorio al reducir la producción de ON de en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) al modular citocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2, CXCL10 y TNF- $\alpha$ . Estos resultados sugieren el consumo de frijol como prevención de las ENTs debido a la capacidad antiinflamatoria asociada a los compuestos bioactivos como CF y AGCC.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L., digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica *in vitro*, inflamación, óxido nítrico, citocinas.

## ABSTRACT

Due to changes in the food pattern and Mexican lifestyle, the incidence of non-communicable diseases (NCD) like: obesity, type 2 diabetes, cancer and cardiovascular diseases had increase which are preceded by a state of chronic inflammation. Diet has been related to the development or inhibition of NCD. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), traditional element in mexican diet, is an important source of protein and carbohydrates as well as bioactive components like: phenolic compounds (PC) and fiber. These components can interact with other elements in the food matrix and alter their stability during digestion, so is important to know the bioaccessibility and bioavailability of this food constituents. Non-digestible fraction (NDF) is the portion that had resisted digestion through the digestive tract and reaches the colon where both, carbohydrates and PC, can be fermented, being short chain fatty acids (SCFA) and phenolic acids, among other metabolites, the main products of this process. The objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory capacity of the colonic fermented extract of the non-digestible fraction (NDF) of cook common bean on different inflammation markers like nitric oxide (NO) and different inflammatory process proteins. Therefore, common bean and extracts from gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro* were characterized. PC were released throughout gastrointestinal digestion, with a significant amount in 12 h colonic fermented extract (gallic acid, (+)-catechin, caffeic acid). Bioaccessible compounds exhibited absorptions from 48.79 to 74.34%. PC, dietary fiber and oligosaccharides that reached the colon were fermented by the microbiota, producing metabolites of PC (3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic) and SCFA (acetate, propionate and butyrate). Bean NDF fermented extract showed anti-inflammatory potential by reducing NO production in lipopolysaccharide stimulated macrophages by modulating cytokines such as CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2, CXCL10 and TNF- $\alpha$ . These results suggest bean consumption as a prevention of NCDs due to the anti-inflammatory capacity associated with bioactive compounds such as PC and SCFA.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L., *in vitro* gastrointestinal digestion, *in vitro* colonic fermentation, inflammation, nitric oxide, cytokines.

## DEDICATORIA

A Dios

A mis padres, Miguel y Mercedes

A mi novio, Roberto

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por su apoyo, ayuda y comprensión en esta etapa de mi vida.

A mi novio, por su compañía y amor todo este tiempo, por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra Flavia Loarca, por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra Rocio Campos, por su guía y ayuda en diferentes técnicas de laboratorio, así como en el trabajo escrito.

A los demás miembros del comité, la Dra Marcela Gaytán, el Dr Jorge Acosta y a la Dra María de la Luz, por su pronta respuesta y ayuda para todo lo requerido, revisiones, firmas y demás.

A mis compañeros de laboratorio y de posgrado, por su ayuda en el transcurso de la maestría y en la experimentación en el laboratorio.

A Carmelita y demás personal administrativo por su apoyo en los trámites académicos.

A los demás encargados de los distintos laboratorios que apoyaron para la realización de este trabajo, con el uso y capacitación de sus diferentes equipos.

A mis amigos, por aguantar mi ausencia durante el tiempo de realización de la maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por abrirme nuevamente sus puertas y darme la oportunidad de estudiar un posgrado.

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

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
2.1 Frijol común ( <i>P. Vulgaris</i> L) .....	2
2.2 Composición química del grano .....	2
2.2.1 Proteína .....	4
2.2.2 Lípidos .....	4
2.2.3 Carbohidratos .....	5
2.2.4 Otros componentes .....	6
2.3 Compuestos bioactivos .....	6
2.3.1 Fibra total dietaria .....	6
2.3.1.1 Ácidos grasos de cadena corta .....	7
2.3.2 Compuestos fenólicos .....	8
2.3.2.1 Definición, clasificación y estructura .....	8
2.3.2.2 Actividad y biodisponibilidad .....	11
2.3.2.3 Compuestos fenólicos en el frijol.....	12
2.4 Fracción no digerible .....	13
2.4.1 Definición.....	13
2.4.2 Composición.....	13
2.5 Inflamación.....	14
2.5.1 Modelo de macrófago murino .....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>

<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Objetivo general .....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
<b>V. METODOLOGÍA .....</b>	<b>21</b>
5.1 Materiales.....	21
5.1.1 Compuestos químicos .....	21
5.1.2 Materia prima.....	21
5.1.3 Material biológico.....	21
5.2 Métodos .....	22
5.2.1 Tratamiento térmico del frijol común.....	22
5.2.2 Composición química .....	22
5.2.2.1 Determinación de humedad .....	22
5.2.2.2 Determinación del extracto etéreo .....	23
5.2.2.3 Determinación de proteínas .....	23
5.2.2.4 Determinación de cenizas.....	24
5.2.3 Composición nutracéutica .....	25
5.2.3.1 Fibra insoluble.....	25
5.2.3.2 Fibra soluble.....	25
5.2.3.3 Cuantificación de almidón resistente.....	26
5.3 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	26
5.3.1 Simulación de las condiciones de la boca .....	26
5.3.2 Simulación de las condiciones del estómago .....	27
5.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado .....	27
5.3.4 Técnica del saco intestinal invertido de rata .....	28
5.3.5 Manejo de animales.....	28
5.3.6 Sacrificio de animales y preparación del saco intestinal invertido .....	28

5.3.7	Manejo de los animales después del sacrificio .....	29
5.3.8	Fermentación <i>in vitro</i> de la FND .....	29
5.4	Potencial nutracéutico .....	31
5.4.1	Determinación de compuestos fenólicos .....	31
5.4.1.1	Extracción metanólica .....	31
5.4.1.2	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en HPLC 31	
5.4.1.3	Identificación y cuantificación de metabolitos de compuestos fenólicos en HPLC .....	32
5.4.2	Análisis y Cuantificación de Oligosacáridos por HPLC .....	33
5.4.3	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	33
5.4.4	Evaluación de capacidad antioxidante.....	34
5.4.4.1	ABTS.....	34
5.4.4.2	DPPH .....	35
5.5	Cálculos .....	36
5.5.1	Coeficiente de permeabilidad aparente (CP o $P_{app}$ ), Coeficiente de permeabilidad neta ( $CP_{neta}$ $P_{app\ neta}$ ) y Relación de Flujo de Salida.....	36
5.5.2	Flujo de Agua (FA).....	37
5.5.3	Viabilidad y cuantificación de absorción de glucosa del intestino .....	37
5.6	Ensayo biológico .....	37
5.6.1	Cultivo celular .....	38
5.6.1.1	Ensayo de viabilidad celular.....	38
5.6.2	Determinación de la producción de óxido nítrico (ON) .....	39
5.6.3	Cuantificación de marcadores de inflamación celular por medio de la técnica de inmunoensayo.....	40
5.6.3.1	Preparación de solución amortiguadora de lisis.....	40
5.6.3.2	Cuantificación de proteínas por el método BCA.....	41

5.7	Análisis estadístico.....	41
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
6.1	Composición química.....	42
6.2	Contenido de fibra insoluble, soluble y almidón resistente.....	44
6.3	Contenido de compuestos fenólicos libres en el extracto metanólico y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	45
6.4	Contenido de metabolitos de compuestos fenólicos en los distintos tiempos de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible de frijol común cocido ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Variedad bayo madero. ....	53
6.5	Capacidad antioxidante del extracto metanólico y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero. ....	54
6.6	Flujo de agua y viabilidad en saco intestinal invertido durante ensayo de permeabilidad <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero. ....	56
6.7	Contenido de oligosacáridos en frijol cocido y durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	59
6.8	Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero sobre el pH.....	62
6.9	Contenido de ácidos grasos de cadena corta en distintos tiempos de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la Fracción No Digerible de frijol común cocido ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero. ....	63
6.10	Contenido de proteína en fracción no digerible y fermentación colónica <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero. ....	66
6.11	Efecto del extracto fermentado de la fracción no digerible en macrófagos murino.....	68
6.11.1	Efecto del extracto de fermentación de la fracción no digerible de frijol común sobre la viabilidad celular. ....	69
6.11.2	Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con LPS. ....	72

6.11.3 Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de citocinas en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con LPS.....	75
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>82</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del grano de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..3	
Cuadro 2. Composición química de la fracción no digerible de frijol común cocido ( <i>P. vulgaris</i> L., cv Negro 8025).....14	
Cuadro 3. Contenido proximal de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero.....42	
Cuadro 4. Contenido de fibra total, soluble e insoluble y almidón resistente en frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido, variedad Bayo Madero.....44	
Cuadro 5. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos libres de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero.....47	
Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos libres de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero, en la fracción biodisponible.....49	
Cuadro 7. Coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y relación de flujo de compuestos fenólicos de frijol común.....51	
Cuadro 8. Contenido de metabolitos en distintos tiempos de fermentación colónica <i>in vitro</i> .....53	
Cuadro 9. Capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero.....55	
Cuadro 10. Flujo de agua en intestinos de ratas Wistar después de diferentes tiempos de incubación.....57	
Cuadro 11. Transporte de glucosa en un modelo de saco intestinal invertido.....58	

Cuadro 12. Contenido de oligosacáridos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero.....	60
Cuadro 13. Efecto de la Fracción No Digerible (FND) de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero sobre el pH de fermentación colónica <i>in vitro</i> .....	62
Cuadro 14. Contenido de ácidos grasos de cadena corta en distintos tiempos de fermentación colónica <i>in vitro</i> de la Fracción No Digerible de frijol común cocido ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.....	65
Cuadro 15. Contenido de proteína en fracción no digerible y extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Bayo Madero.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del fenol.....	9
Figura 2. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.....	9
Figura 3. Estructura genérica de flavonoides.....	10
Figura 4. Estructura genérica de la mayoría de los flavonoides.....	10
Figura 5. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la viabilidad celular en macrófagos murino RAW 264.7 sin lipopolisacáridos.....	69
Figura 6. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la viabilidad celular en macrófagos murino RAW 264.7 con lipopolisacáridos.....	71
Figura 7. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos murino RAW 264.7 con lipopolisacáridos.....	73
Figura 8. Concentración media inhibitoria de ON para EF 12 h en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.....	74
Figura 9. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la producción de proteínas de inflamación en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos.....	76

## I. INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades no transmisibles (ENTs) ha ido en aumento, afectando a gran parte de la población mundial, incluyendo a México. Éstas constituyen las principales causas de muerte en el país, entre las que encontramos a la diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Se ha demostrado que estas enfermedades se originan de un estado inflamatorio (Tracey, 2002; Libby, 2007; Oberyszyn, 2007; Medzhitov, 2008; García-Lafuente *et al.*, 2009; INEGI, 2015).

La inflamación se puede desencadenar por infección, lesión o mal funcionamiento del tejido, que tiene como propósito la defensa, reparación, adaptación o restauración de la homeostasis. Pero una inflamación crónica puede tener consecuencias como el desarrollo de ENTs (Medzhitov, 2008).

Este proceso inflamatorio puede estar modulado por la dieta, la cual provee compuestos bioactivos los cuales pudieran tener un efecto antiinflamatorio (Champ, 2002; Beninger y Hosfield, 2003; Vergara-Castañeda *et al.*, 2012).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una importante fuente de proteínas y carbohidratos complejos principalmente para algunos sectores de la población, además de aportar otros nutrientes esenciales como fibra, vitaminas y minerales, también contienen compuestos fenólicos y otros fitoquímicos (Campos-Vega *et al.*, 2010; Mojica *et al.*, 2015; Castro-Rosas *et al.*, 2016).

El consumo de esta leguminosa se ha asociado a la disminución del riesgo de padecer enfermedades no transmisibles (Bazzano *et al.*, 2001; Leterme, 2002; Darmadi *et al.*, 2004). Por lo que es de importancia científica investigar y determinar la capacidad antiinflamatoria del extracto de fermentación colónica de la fracción no digerible (EFFND) de frijol sobre diferentes marcadores de inflamación, para dilucidar las posibles vías en las que los compuestos presentes en esta fracción pudieran tener su efecto.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Frijol común (*P. Vulgaris* L)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta nativa de América, más específicamente de las regiones Andina y Mesoamericana, y es consumida alrededor del mundo (Paredes-López *et al.*, 2006).

Es uno de los cultivos para el consumo humano más importantes en todo el mundo (Broughton *et al.*, 2003). La contribución del frijol en la alimentación del mexicano ha ido disminuyendo, el consumo de frijol per cápita en México en el año 1990 se ubicó en 19.2 kg, para el año 2006 fue de 14.3 kg y para el año 2008 su consumo fue de 11 kg (García-Urigüen, 2012).

### 2.2 Composición química del grano

El frijol común es rico en proteína y fibra. Aporta carbohidratos no digeribles y algunos otros compuestos bioactivos como: compuestos fenólicos, fitoesteroles y saponinas entre otros. Los carbohidratos no digeribles pueden ser fermentados en el colon por la microbiota produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como: ácido acético, propiónico y butírico, a los que se les ha comprobado un efecto benéfico en la salud del colon (Campos-Vega *et al.*, 2009); los compuestos fenólicos también pueden ser transformados en el colon a ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cumárico, ácido hidroxifenilpropiónico, ácido fenilpropiónico) que se ha comprobado tienen actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006; Cardador-Martínez *et al.*, 2006; Bazzocco *et al.*, 2008).

En el Cuadro 1 se muestra la composición química del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

**Cuadro 1.** Composición química del grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONTENIDO (%)</b>
Proteína	14-33
Lípidos	1.6-6.2
Fibra total	14-19
Insoluble	10.1-13.4
Soluble	3.1-7.6
Cenizas	2.9-4.5
Carbohidratos	52-76
<b>CALIDAD DE PROTEÍNA</b>	
Digestibilidad	52-75
Relación de eficiencia proteínica	0.7-1.5
<b>AMINOÁCIDOS ESENCIALES (g/100g proteína)</b>	
Fenilalanina + Tirosina	5.3-8.2
Isoleucina	2.8-5.8
Leucina	4.9-9.9
Lisina	6.4-7.6
Metionina + Cisteína	1.1-1.5
Treonina	4.4-7.0
Triptófano	-
Valina	4.5-6.7
<b>VITAMINAS (mg/100g)</b>	
Tiamina (B1)	0.86-1.14
Riboflavina (B2)	0.14-0.27
Niacina (B3)	1.16-2.68
Piridoxina (B6)	6.34-0.64
Ácido fólico	0.17-0.58
<b>MINERALES (mg/100 g)</b>	
Calcio	9-200
Cobre	0.7-1.2
Fósforo	460
Hierro	3.8-7.6
Magnesio	200
Zinc	2.2-4.4
<b>OTROS COMPONENTES</b>	
Taninos (mgeq.cat./g) <sup>a</sup>	9.6-131.4
Inhibidores de tripsina (UIT/mg) <sup>b</sup>	13-29
Ácido fítico (%)	0.6-2.7

<sup>a</sup> mg de equivalentes de catequina por gramo. <sup>b</sup> Unidades de inhibición de tripsina por mg. (Paredes-López *et al.*, 2006)

### 2.2.1 Proteína

El contenido de proteína del frijol común va desde 14 a 33 %, tiene un alto nivel de lisina que va de 6.4-7.6 g/100 g de proteína, aunque es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano (Carbonaro *et al.*, 2000; Paredes-López *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que las proteínas tanto de plantas como de animales proveen péptidos biológicamente activos que tienen actividad antihipertensiva, opioide, antioxidante, anticolesterolémica, antimicrobial, antitrombótica, anticancerígena e inmunomoduladora (Torruco-Uco *et al.*, 2008). Estos péptidos son producidos ya sea por digestión gastrointestinal, fermentación o hidrólisis de diferentes proteínas (Korhonen y Pihlanto, 2003; Wang y De Mejía, 2005).

Mediante hidrólisis, se han encontrado péptidos bioactivos en dos tipos de frijol común, Negro 8025 y Pinto Durango, los cuáles inhibieron la transactivación de NF- $\kappa$ B y la traslocación nuclear de la subunidad NF- $\kappa$ B p65 (Oseguera-Toledo *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Lípidos

El porcentaje de lípidos en el grano depende de la variedad, va de 1.5 a 6.2 %; Campos-Vega *et al.*, (2009) reportaron valores más bajos que van de 0.4-2 % en frijol tanto crudo como cocido. Estas diferencias pueden atribuirse al tipo de frijol, sitio de producción, el clima y temporada de cosecha, entre otros factores.

El frijol contiene una importante cantidad de ácidos grasos, en particular ácidos grasos insaturados como el oleico (7-10 %), linoleico (21-28 %), y linolénico (37-54 %) (Paredes-López *et al.*, 2006).

Los fosfolípidos y triacilglicéridos son los componentes lipídicos mayoritarios, aunque también puede presentar en menores cantidades diacilgliceroles, hidrocarburos y esteril ésteres (Yoshida *et al.*, 2005).

Recientemente se estudió el índice aterogénico (AI) y el índice trombogénico (TI) según el perfil de ácidos grasos de diferentes leguminosas, incluidas el frijol común, concluyendo que estas leguminosas tienen características funcionales para la salud humana (Lo Turco *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Carbohidratos

El mayor componente de las leguminosas son los carbohidratos que representan del 52-76 % de la semilla de frijol, de estos carbohidratos el almidón representa del 35-60 %. También es fuente de fibra con un valor de entre 14-19 %, pero al someterlo a cocción, esta aumenta hasta aproximadamente 27 %. En cuanto a oligosacáridos, su aporte va de 2-6 % (Hoover y Zhou, 2003; Paredes-López *et al.*, 2006).

El almidón de las leguminosas contribuye a disminuir la liberación de glucosa, provocando un índice glicémico bajo (Rizkalla *et al.*, 2002; Winham *et al.*, 2007). El consumo de leguminosas con bajo índice glicémico se ha asociado a diversos beneficios a la salud, disminuyendo factores de riesgo de enfermedades como: obesidad, diabetes y enfermedades coronarias (Rizkalla *et al.*, 2002; McCrory *et al.*, 2010).

Los carbohidratos que llegan al colon, pueden ser fermentados y transformados a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la producción de éstos se estudió en la fracción no digerible de diferentes tipos de frijol común con los siguientes resultados: el ácido acético fue el de mayor producción, seguido del propiónico y del butírico. La mayor producción de ácido butírico se generó al proporcionar granos de las variedades Bayo Madero y Negro 8025 (Campos-Vega *et al.*, 2009). Investigaciones *in vitro* e *in vivo* sugieren que el ácido butírico es el principal protector contra el cáncer de colon (Roberfroid, 2001).

#### 2.2.4 Otros componentes

El frijol común aporta una gran cantidad de vitaminas hidrosolubles, como tiamina, niacina y ácido fólico. En cuanto a minerales es una buena fuente de calcio, fósforo, hierro, magnesio y zinc (Paredes-López *et al.*, 2006).

### 2.3 Compuestos bioactivos

El frijol común (*P. vulgaris* L.) es considerado un alimento nutracéutico debido a que contiene varios componentes bioactivos como: fibra, péptidos bioactivos, compuestos fenólicos, inhibidores de enzimas, lectinas y fitatos. Se ha comprobado que son sustancias bioactivas que tienen efecto sobre la proliferación de células carcinogénicas y modelos *in vivo* de cáncer, entre otros beneficios a la salud (Champ, 2002; Beninger y Hosfield, 2003; Campos-Vega *et al.*, 2010; Vergara-Castañeda *et al.*, 2012; Luna-Vital *et al.*, 2014). Algunos de estos componentes se han considerado factores antinutricios como los inhibidores de enzimas que pueden reducir la digestibilidad de las proteínas, y como la lectina que puede afectar la absorción de nutrientes, sin embargo, estos compuestos son termolábiles y su efecto tóxico se elimina por la cocción (Carbonaro *et al.*, 2000; Lajolo y Genovese, 2002).

El consumo de carbohidratos no digeribles se ha relacionado a un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles, ya que su fermentación produce ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico, y butírico (Campos-Vega *et al.*, 2012a).

#### 2.3.1 Fibra total dietaria

La Asociación Americana de la Química de Cereales (AACC por sus siglas en inglés) define a la fibra dietaria como “la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino

delgado del humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra dietaria incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias asociadas a plantas. La fibra dietaria promueve efectos fisiológicos beneficiosos incluyendo efecto laxante, y/o disminución del colesterol en sangre, y/o atenuación de glucosa en sangre”.

También la fibra puede ser sustrato de la fermentación colónica, ya que ésta no es digerida por enzimas gastrointestinales y afectan el crecimiento y/o la actividad de las bacterias colónicas que son las responsables de producir ácidos grasos de cadena corta, principalmente el acético, propiónico y butírico (Robertfroid, 2001). Éstas propiedades pueden resultar en flatulencias indeseables, pero también en un efecto prebiótico potencial (Trindade *et al.*, 2003). Se ha encontrado que el frijol produce una alta proporción de butirato después de su fermentación en el colon de ratas (Henningsson *et al.*, 2001).

Algunos de los beneficios de estos ácidos de cadena corta son que estimulan la absorción de agua y de minerales, que resulta en una más rápida recuperación en casos de diarrea y también como prevención en deficiencias de minerales (Younes *et al.*, 2001). Se ha encontrado que el ácido butírico induce apoptosis, inhibe proliferación y lleva a una mayor diferenciación de fenotipos en líneas celulares de carcinoma de colon en humanos (Avivi-Green *et al.*, 2002; Hinnebusch *et al.*, 2002). El ácido propiónico que se metaboliza en hígado puede suprimir la síntesis de colesterol y puede aumentar las propiedades antiproliferativas del butirato (Beyer-Sehlmeyer *et al.*, 2003).

#### 2.3.1.1 Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son los productos principales de la actividad fermentativa de la microbiota intestinal (Cummings *et al.*, 1987). Estos compuestos se absorben en el intestino grueso y se definen como ácidos grasos volátiles de 1 a 6 átomos de carbono que pueden presentar una conformación de

cadena lineal o ramificada. El ácido acético (C2), el ácido propiónico (C3) y el ácido butírico (C4) son los más abundantes, representando el 90-95% de los SCFA presentes en el colon (Ríos-Covián *et al.*, 2016). Al fermentarse la fibra y otros compuestos, el pH disminuye acidificando el medio, donde las bacterias *Bifidobacterias* y *Lactobacterias* están en condiciones más apropiadas para su desarrollo (Kulkarni y Reddy, 1994).

Diferentes trabajos relacionan los metabolitos producidos por la microbiota intestinal con diversos roles funcionales llevados a cabo por AGCC, afectando diversos procesos fisiológicos y que pudieren contribuir con la salud y la enfermedad (Koh *et al.*, 2016).

El ácido butírico es la fuente de energía preferida para los colonocitos y es localmente consumido, mientras que otros AGCC absorbidos drenan en el portal vena. El ácido propiónico se metaboliza en el hígado y, por lo tanto, es solo presente a baja concentración en la periferia, dejando al ácido acético como el AGCC más abundante en la circulación periférica (Cummings *et al.*, 1987).

Se han encontrado distintas funciones de estos AGCC, entre los que encontramos inhibición del apetito del ácido acético (Frost *et al.*, 2014). efectos antiinflamatorios del ácido butírico, y en menor medida del ácido propiónico (Johnstone, 2002). El ácido butírico es la fuente principal de energía de los colonocitos, y también protege contra cáncer colorectal e inflamación al inhibir la histona deacetilasa (Flint *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Compuestos fenólicos

#### 2.3.2.1 Definición, clasificación y estructura

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que son derivados de las vías de pentosa fosfato, del ácido shikímico, y de fenilpropanoides en las plantas

(Randhir *et al.*, 2004). Estos compuestos juegan un papel importante en la protección contra patógenos y predadores, así como también contribuyen en el crecimiento y la reproducción de las plantas (Shahidi y Naczk, 2004).

Los compuestos fenólicos se componen de un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Shahidi y Naczk, 2004). La Figura 1 muestra la estructura química del fenol.

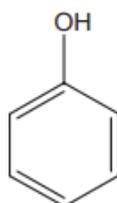


Figura 1. Estructura del fenol (Vermerris y Nicholson, 2008).

Los ácidos fenólicos se dividen en dos subgrupos: a) ácidos hidroxibenzoicos y b) ácidos hidroxicinámicos (Balasundram *et al.*, 2006). La Figura 2 muestra ejemplos de estructuras químicas de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.

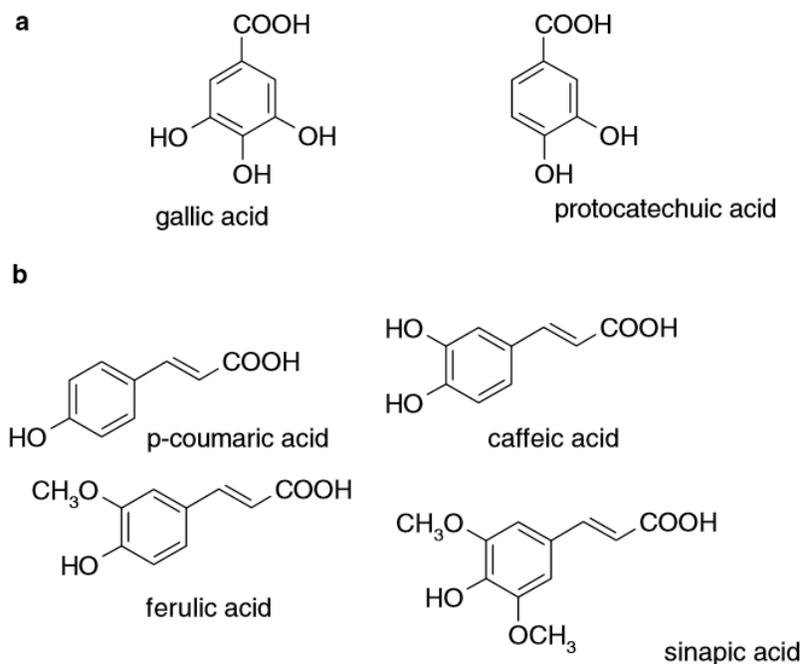


Figura 2. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (Balasundram *et al.*, 2006).

Los flavonoides consisten de 15 carbonos con configuración  $C_6-C_3-C_6$ . Su estructura consiste en 2 anillos aromáticos A y B, unidos por un puente de 3 carbonos, usualmente en la forma de un anillo heterocíclico C (Balasundram *et al.*, 2006). La Figura 3 muestra la estructura química de flavonoides.

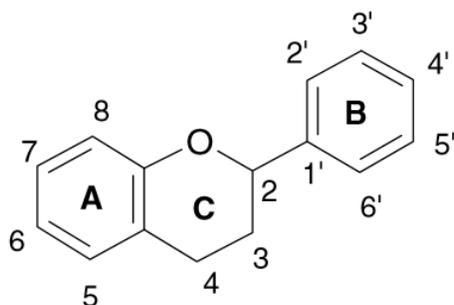


Figura 3. Estructura genérica de flavonoides (Balasundram *et al.*, 2006).

Variaciones en el anillo C resultan en: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (o catequinas), isoflavonas, flavanonoles, y antocianidinas (Balasundram *et al.*, 2006). La figura 4 muestra la estructura química de algunos de estos flavonoides.

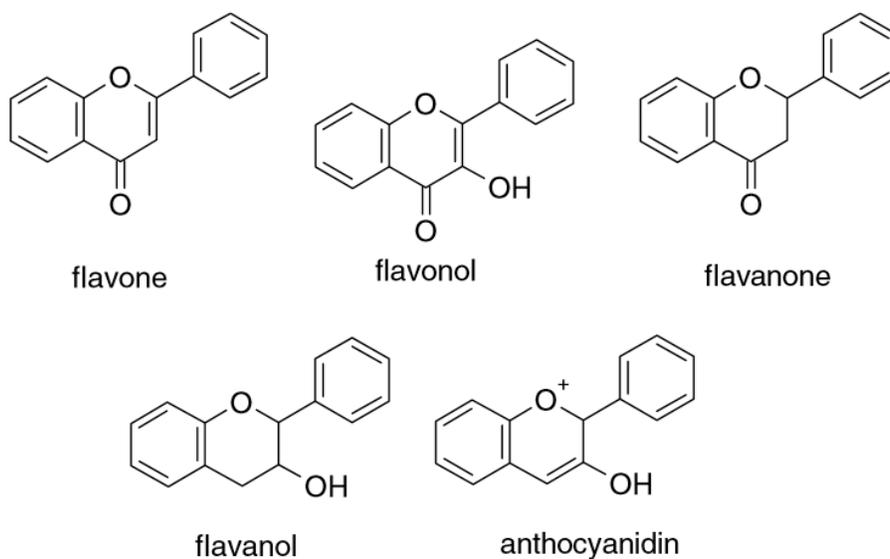


Figura 4. Estructura genérica de la mayoría de los flavonoides (Balasundram *et al.*, 2006).

Los flavonoides están generalmente presentes como glicósidos con un azúcar unido a través de un grupo OH (conocido como flavonoide O-glicosilo) o a través de un enlace carbono-carbono (conocido como flavonoide V-glicosil). Pueden variar en el número y la distribución de grupos hidroxilo, así como en su grado de alquilación o glicosilación. La formación de glucósidos de flavonoles y flavonas depende de la acción de la luz; por lo tanto, se encuentran principalmente en las hojas y las pieles de frutas (Shahidi y Naczk, 2004).

#### 2.3.2.2 Actividad y biodisponibilidad

Los compuestos fenólicos han mostrado efecto antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobial, antitrombótico, cardioprotector y vasodilatador (Middleton *et al.*, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a la capacidad de atrapar radicales libres o quelar cationes de metales (Amarowicz *et al.*, 2004).

La mayoría de los polifenoles de la dieta se transforman en el colon por la microbiota intestinal antes de la absorción. Esta conversión es a menudo esencial para la absorción y modula la actividad biológica de estos compuestos dietéticos (Setchell *et al.*, 2002). La microbiota colónica puede fermentar los compuestos fenólicos que llegan al colon a ácidos fenólicos como: ácido hidroxifenilpropiónico y ácido fenil propiónico (Bazzocco *et al.*, 2008).

La hidrólisis de los glucósidos resulta en metabolitos que son potencialmente más activos biológicamente que los compuestos originales. Además, la transformación bacteriana de agliconas puede conducir a la producción de compuestos más o menos activos, dependiendo del sustrato que está siendo metabolizado y los productos formados (Rechner *et al.*, 2004; Lampe y Chang, 2007).

La variedad de efectos en la salud de cada compuesto fenólico entre diferentes personas son el resultado de la variabilidad interindividual en la ecología microbiana

del intestino, lo que determina la absorción de compuesto fenólico. Por lo tanto, los estudios que examinan los efectos de los compuestos fenólicos podrían mejorarse teniendo en cuenta la absorción de compuesto, ya que parece ser un factor controlable (Selma *et al.*, 2009).

Los polifenoles se encuentran en altos niveles en frijoles de diferentes colores; y se han señalado como posibles agentes que combaten el cáncer y la aterosclerosis (Paredes-López *et al.*, 2006).

### 2.3.2.3 Compuestos fenólicos en el frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) contiene distintos compuestos fenólicos que incluyen: flavonoides como antocianinaoacas, flavonoles, proantocianidinas, así como una amplia gama de ácidos fenólicos (Beninger y Hosfield, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b), se encuentran principalmente en la cubierta de la semilla (de Mejía *et al.*, 1999). La presencia de antocianinas ha sido reportada sólo en frijoles de coloraciones negra y azul-violeta (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006). El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en frijol común, así como niveles intermedios de ácidos *p*-cumárico y sinápico (Campos-Vega *et al.*, 2012b).

Se ha demostrado actividad biológica de los flavonoides de frijol común en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*; principalmente las antocianinas y proantocianidinas se han reportado con capacidad antioxidante (Tsuda *et al.*, 1994; Cardador-Martínez *et al.*, 2002b; Beninger y Hosfield, 2003) y antimutagénica (De Mejía *et al.*, 1999; Cardador-Martínez *et al.*, 2002a; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a). Aparicio-Fernández *et al.*, (2008) reportaron que el extracto metanólico de frijol negro “Jamapa” mostró correlación entre su concentración de proantocianidinas y su capacidad antiradical, así como su capacidad antiproliferativa en células HeLa (de adenocarcinoma humano) y sugiere que los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico indujeron apoptosis y demostraron incremento en la expresión

de proteínas como Caspasa 3 y Bax, indispensables para la apoptosis en células cancerígenas.

## 2.4 Fracción no digerible

### 2.4.1 Definición

La fracción no digerible es una parte del alimento que ha resistido la digestión gastrointestinal y que contiene diversos compuestos bioactivos que alcanza el colon (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

Esta fracción no digerible, se ha relacionado con la prevención y/o reducción de enfermedades crónicas no transmisibles; algunos de estos compuestos pueden ser fermentados por la microflora produciendo ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético, propiónico y butírico (Delzenne *et al.*, 2003). Al ácido butírico se le conoce como agente preventivo, porque inhibe la proliferación celular de tumores e induce apoptosis (Sengupta, Muir y Gibson, 2006).

### 2.4.2 Composición

Feregrino-Pérez *et al.*, (2014) caracterizaron la fracción no digerible del frijol común Negro 8025, comparándola con el contenido de frijol cocido que se realizó en un estudio previo (Feregrino *et al.*, 2008), esta fracción no digerible mostró un menor contenido de proteínas, de lípidos, carbohidratos, cenizas y taninos, pero un mayor contenido de fibra dietaria. Éstos resultados en cuanto a composición de la fracción no digerible son comparables con otras investigaciones (Costa de Oliveira, *et al.*, 2001; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010; Cruz-Bravo *et al.*, 2011) que demuestran que

la fracción no digerible del frijol contiene cantidades significativas de fibra que se ha relacionado como componente bioactivo.

En el Cuadro 2. Se muestra la composición de la fracción no digerible del frijol común.

**Cuadro 2.** Composición química de la fracción no digerible de frijol común cocido (*P. vulgaris* L., cv Negro 8025).

<b>Componente</b>	<b>Frijol cocido*</b>	<b>Fracción no digerible</b>
Lípidos	1.4 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.06 <sup>b</sup>
Cenizas	4.1 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.008 <sup>b</sup>
Proteínas <sup>1</sup>	23.1 ± 0.07 <sup>a</sup>	21.3 ± 0.06 <sup>b</sup>
Carbohidratos <sup>1</sup>	71.8 ± 0.22 <sup>a</sup>	61.7 ± 0.05 <sup>b</sup>
Fracción no digerible <sup>1</sup>	57.5 ± 0.05 <sup>a</sup>	ND
<b>Fibra dietaria<sup>1</sup></b>		
Fibra total <sup>1</sup>	26.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	61.8 ± 0.5 <sup>b</sup>
Fibra soluble <sup>1</sup>	6.0 ± 0.01 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.04 <sup>b</sup>
Fibra insoluble <sup>1</sup>	20.0 ± 0.03 <sup>a</sup>	53.1 ± 0.03 <sup>b</sup>
Almidón resistente	30.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	39.3 ± 0.15 <sup>b</sup>
Oligosacáridos <sup>2</sup>	6.8 ± 0.48 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.48 <sup>b</sup>
Taninos condensados <sup>3</sup>	15.1 ± 1.53 <sup>a</sup>	9.1 ± 0.27 <sup>b</sup>
Flavonoides totales <sup>4</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>

(Feregrino-Pérez *et al.*, 2014).

## 2.5 Inflamación

La inflamación es una respuesta adaptativa que es desencadenada por estímulos y condiciones nocivas, tales como la infección y la lesión tisular (Kumar *et al.*, 2003; Majno y Joris, 2004). La respuesta inflamatoria desencadenada por una infección o

por lesión tisular involucra la llegada de componentes de la sangre (plasma y leucocitos) al sitio de infección o lesión (Kumar *et al.*, 2003; Majno y Joris, 2004).

La inflamación crónica ocurre en muchas enfermedades, incluidas la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Este tipo de estado inflamatorio crónico no parece ser causado por infección o lesión, sino por un mal funcionamiento del tejido (Medzhitov, 2008).

El reconocimiento inicial de la infección es mediado por los macrófagos tisulares y los mastocitos, que conduce a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios, incluyendo las quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y los productos de las cascadas proteolíticas. El efecto principal es mandar una señal para atraer a otros leucocitos, principalmente neutrófilos, que son los primeros en llegar, que normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos y tienen que acceder a través de las vénulas postcapilares, a los tejidos extravasculares en el lugar de infección (o lesión) (Pober y Sessa, 2007). Los monocitos llegan más tarde y se pueden transformar en macrófagos a medida que evoluciona el proceso infeccioso (Fox, 2008). Los inductores exógenos de la respuesta inflamatoria pueden ser moléculas que se reconocen como de células invasoras, denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PMAP), los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana de las bacterias gram-negativas son las más conocidas (Fox, 2008). Los inductores endógenos pueden ser señales producidas por estrés, daño o mal funcionamiento del tejido (Medzhitov, 2008). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por fagocitos, también tienen un papel en convertir lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en señales de inflamación al oxidar sus componentes, como lípidos y proteínas (Navab *et al.*, 2006). Estos inductores desencadenan la producción de numerosos mediadores de inflamación que, a su vez, alteran la funcionalidad del tejido u órgano. Estos mediadores pueden ser derivados de proteínas plasmáticas o producidas por leucocitos especializados (macrófagos residentes o mastocitos) (Kumar *et al.*, 2003; Majno y Joris, 2004).

Además, pueden ser clasificados en aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fragmentos de componentes del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y enzimas proteolíticas (Kumar *et al.*, 2003; Majno y Joris, 2004).

En cuanto a los mediadores lipídicos, éstos son derivados de fosfolípidos, como fosfatidilcolina, que por medio de la fosfolipasa A2 genera ácido araquidónico y ácido lisofosfatidítico. El ácido araquidónico es metabolizado por ciclooxigenasas (COX1 y COX 2) y forma eicosanoides (prostaglandinas y trombozanos) o puede ser metabolizado por lipoxigenasas generando leucotrienos y lipoxinas (Kumar *et al.*, 2003). Las lipoxinas inhiben la inflamación y promueven reparación del tejido (Serhan, 2007).

Otros marcadores son, las interleucinas (IL), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (ON) entre otros. La transcripción de mediadores proinflamatorios es inducida por NF- $\kappa$ B, como la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), COX-2, TNF- $\alpha$  y (IL)-1 $\beta$ , -6 y -8 (Bredt, 1999; Alderton *et al.*, 2001; Kleinert *et al.*, 2004).

Al ocurrir un desbalance entre la activación de agentes proinflamatorios y la señalización antiinflamatoria, conlleva a una inflamación crónica mediada por macrófagos. Si la estimulación no es eliminada, el proceso puede persistir y evolucionar (Pober y Sessa, 2007). Esto puede causar que continúe el estrés celular, que puede llevar a aterosclerosis, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Tracey, 2002; Libby, 2007; Oberyszyn, 2007; García-Lafuente *et al.*, 2009).

En estudios epidemiológicos se han demostrado que poblaciones que consumen alimentos ricos en compuestos fenólicos tienen una menor incidencia de enfermedades de inflamación crónica (Yoon y Baek, 2005).

Otros estudios relacionan el efecto benéfico del consumo de frijol común y la reducción de enfermedades crónicas relacionadas con la inflamación como el

cáncer de colon (Boateng *et al.*, 2007; Reynoso-Camacho *et al.*, 2007), y la diabetes mellitus (Tormo *et al.*, 2006).

García-Lafuente *et al.* (2014) evaluaron el efecto antioxidante y antiinflamatorio de extractos metanólicos ricos en polifenoles provenientes de frijol blanco y rojo: *white kidney bean* (WKB) y *round purple bean* (RPB), encontraron que RPB tenía mayor capacidad antioxidante y antiinflamatoria que el frijol WKB al reducir la producción de óxido nítrico (ON) y de interleucinas IL-1 $\beta$  y IL-6 y NF- $\kappa$ B p65 en mayor medida, aunque no notaron efecto significativo en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la diferencia entre los efectos de las variedades lo atribuyeron a la composición de compuestos fenólicos, ya que la variedad RPB contenía una mayor cantidad de proantocianidinas, glucósidos de catequina y ácido sinápico mientras que el grano de la variedad WKB contenía una mayor cantidad de ácidos fenólicos.

Moreno-Jiménez *et al.* (2015) evaluaron los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de extractos metanólicos de cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Negro 8025, Bayo Victoria, Pinto Durango y Pinto Saltillo) procesados por enlatado, en células de cáncer de colon (HT-29), encontrando que el proceso térmico degrada parcialmente algunos compuestos fenólicos, pero incrementa la producción de otros de un modo cultivar-dependiente. Asimismo, se encontró que los extractos reducen, de modo cultivar-dependiente, la expresión de la enzima COX-2 e inhiben la producción de las proteínas pro inflamatorias TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e IL-8 en mayor medida por las variedades Negro 8025 y Pinto Saltillo, aunque también inducen la expresión de proteínas anti inflamatorias como IL-10 y COX-10 en mayor medida por la variedad Bayo Victoria.

### 2.5.1 Modelo de macrófago murino

Los macrófagos son células fagocíticas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis, eliminación de células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento (Geissmann *et al.*, 2010).

Los macrófagos tienen una gran variedad de receptores para reconocer a los patógenos que los hace eficientes para fagocitar e induce la producción de citoquinas inflamatorias (Geissmann *et al.*, 2010). También liberan mensajeros químicos, entre estos los más importantes son: óxido nítrico (ON), el anión superóxido ( $O_2^-$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que son tóxicos para bacterias y otros microorganismos, ya que se busca matar y degradar a los agentes externos. El óxido nítrico es producido principalmente por la forma inducible de la NO sintasa (iNOS) (Janeway *et al.*, 2001).

Estas células al estar en contacto con los lipopolisacáridos se activan (Aderem y Underhill, 1999) y son la principal fuente de factores de crecimiento y citoquinas que afectan al endotelio, células epiteliales y mesenquimales en el microambiente local (Coussens y Werb, 2002).

La línea celular RAW 264.7 necesita la presencia de lipopolisacárido (LPS) para producir óxido nítrico (ON) (Moncada *et al.*, 1991). Esto induce la transcripción y transducción de iNOS con la subsecuente producción de NO (MacMicking *et al.*, 1997).

Los modelos celulares son de utilidad para probar experimentalmente los posibles mecanismos de condiciones o enfermedades. Nos proporciona una ruta para comprender la base biológica de éstas y para probar y desarrollar nuevas terapias (Arends *et al.*, 2016).

El modelo de cáncer es uno de los más importante para la biología tumoral, también lo están siendo los modelos de trastornos inflamatorios e inmunomediados, como en la enfermedad inflamatoria intestinal, donde se analizan las interacciones entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Mizoguchi *et al.*, 2016).

Por todo lo anterior, los modelos de cultivo celular son de utilidad para la evaluación o investigación inicial en el acercamiento a la bioactividad de moléculas presentes en alimentos (Liu y Finley, 2005).

### III. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) presenta una gran variedad de compuestos bioactivos, entre ellos, los compuestos fenólicos, como flavonoides (antocianinas, proantocianidinas, flavanoles, flavonas, flavanonas y chalconas) y ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cumárico) y fibra.

La microbiota colónica puede fermentar y transformar estos compuestos a ácidos fenólicos como: ác. cumárico, ác. felúrico y ác. gálico, así como también a ácido hidroxifenilpropiónico y ácido fenil propiónico; y también puede sintetizar ácidos grasos de cadena corta como los ácidos acético, propiónico y butírico; todos estos con capacidades antioxidantes y antiinflamatorias relacionadas con la prevención de enfermedades no transmisibles (ENTs) como: obesidad, diabetes, cardiovasculares y cáncer; las cuales se han relacionado con estrés oxidativo e inflamación crónica. La mayoría de estos estudios se han enfocado en extractos de estos diferentes compuestos presentes en diferentes alimentos, sin embargo, no se han reportado en procesos de digestión a partir de matrices alimentarias como el frijol común cocido.

En estudios preliminares se demostró que el extracto de la fermentación colónica del frijol común inhibió la producción de óxido nítrico (ON), como marcador de inflamación en macrófagos murino. Sin embargo, para dilucidar el mecanismo y para conocer el efecto de este extracto de fermentación sobre la inflamación, se requiere de medir otros marcadores en el mismo modelo, como proteínas del proceso inflamatorio entre las que encontramos diferentes citocinas y quimiocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón  $\gamma$ , interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), entre otras.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto de fermentación de la fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en macrófagos murinos RAW 264.7.

### 4.2 Objetivos particulares

Caracterizar química y nutracéuticamente el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido var. Bayo Madero, cosecha 2015.

Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de la fracción no digerible de frijol común cocido en un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Caracterizar los compuestos bioactivos de la fracción no digerible y del extracto de fermentación colónica *in vitro* del frijol común cocido.

Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto de la fermentación colónica en un modelo de macrófagos murinos RAW 264.7.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Compuestos químicos

Se utilizaron reactivos y solventes de la marca J. R. Baker. Medio de cultivo Modified Eagle Medium (DMEM) de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, Estados Unidos). Suero fetal bovino (SFB). Antibióticos y antimicóticos de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, New York).  $\alpha$ -amilasa, proteasa, amilogucosidasa, pcreatina, pepsina, bilis bovina de Sigma (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd), albúmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.).

#### 5.1.2 Materia prima

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

#### 5.1.3 Material biológico

Se utilizaron catorce ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 250 y 300 g, las cuales fueron adquiridas del bioterio de la UNAM, Campus Juriquilla (Querétaro, Méx.).

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 se cocieron de acuerdo al método de Aparicio-Fernández *et al.*, (2005a). Brevemente, se colocaron 50 g de frijol en un recipiente con 250 mL de agua grado HPLC (1:5 p/v) y se calentó durante 2.5 h a 95 °C. Las semillas cocidas con el caldo fueron liofilizadas, molidas y pasadas a través de una malla número 60 (0.25 mm). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

### 5.2.2 Composición química

Los análisis proximales se aplicaron a la materia prima. El contenido nutricional se cuantificó de acuerdo a los métodos de la AOAC (2002). La cantidad de carbohidratos totales se determinó por la diferencia obtenida del 100 % menos la suma del porcentaje de cenizas, proteína, grasa y humedad.

#### 5.2.2.1 Determinación de humedad

Se siguió el método 925.10 descrito por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula de aluminio previamente tarada a peso constante. Posteriormente, se colocó en una estufa (previamente calentada) a  $130 \pm 3^\circ\text{C}$  por 2 horas. La cápsula fue colocada en un desecador y se registró su peso. Se obtuvo el porcentaje de humedad por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{w_0 - w_f}{w_0} * 100$$

Donde:

$w_0$  = peso inicial de la muestra

$w_f$  = peso final de la muestra

#### 5.2.2.2 Determinación del extracto etéreo

Se siguió el método 920.39 descrito por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en base seca en cartuchos de celulosa, los cuales se colocaron dentro del aparato de extracción Soxhlet. Así mismo, se adicionaron 100 mL de éter de petróleo a los matraces, previamente colocados a peso constante. Los matraces fueron colocados por un tiempo que extracción que dependió de la cantidad de muestra.

Una vez transcurrido el período de extracción, se evaporó el éter de petróleo hasta su completa eliminación y se secó en estufa a 50°C por 4 horas. Finalmente, se pesaron los cartuchos y se determinó el porcentaje de extracto etéreo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EE} = \frac{w_E - w_B}{w_1} * 100$$

Donde:

$w_E$  = peso del extracto

$w_B$  = peso del blanco

$w_1$  = peso de la muestra

#### 5.2.2.3 Determinación de proteínas

Se siguió el método 984.13 descrito por la AOAC (2002). Se pesó 1 g de muestra previamente desgrasada y se colocará en un matraz Kjeldahl, al que se le adicionó 1 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de potasio anhidro y 15 mL de ácido sulfúrico. Tras adicionar los reactivos, se colocaron en un digestor y se calentó gradualmente hasta alcanzar los 400°C.

Una vez observado un cambio en la coloración a verde claro, se detuvo el calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 15 mL de agua destilada para la disolución completa del residuo al interior del matraz y 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 40 %. Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer se añadieron 50 mL de ácido bórico al 4 % previamente preparado (conteniendo como indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol). Éste último se destiló hasta recolectar un total de 300 mL, en el que se observó el cambio en la coloración de morado a verde oscuro, y se valoró al retirarse del destilador con ácido clorhídrico 0.1N.

Como factor de conversión de nitrógeno a proteína se utilizó el valor de 6.25, basado en la suposición de que la proteína promedio alcanza un valor del 16 % de nitrógeno por unidad de peso. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{\text{mL} \times 0.1N \text{ HCl} \times 0.014}{\text{g muestra}} * 100$$

$$\% P = \% N * 6.25$$

#### 5.2.2.4 Determinación de cenizas

Se siguió el método 923.03 descrito por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada y se dejaron carbonizar sobre la flama de un mechero de alcohol. Posteriormente se colocaron en mufla a 550°C, proceso que se suspendió cuando las cenizas se tornaron blancas, en un tiempo que dependió del tipo de muestra. Luego de ello se colocaron las cápsulas en un desecador para enfriar hasta temperatura constante y registrar el peso. El contenido de cenizas se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{w_c}{w_1} * 100$$

Donde:

$w_c$  = peso de las cenizas

$w_1$  = peso de la muestra

### 5.2.3 Composición nutracéutica

#### 5.2.3.1 Fibra insoluble

Para la determinación de la fibra insoluble se utilizó la metodología descrita por Shiga *et al.* (2004). En un envase de vidrio color ámbar se agregó 1 g de la muestra pulverizada y previamente desgrasada, 50 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa. Posteriormente se incubó a 95 °C por 30 min en baño María con agitación continua.

A continuación, ajustó el pH a 7.5 con la muestra atemperada, se adicionaron 100  $\mu$ L de proteasa (5 mg/mL) y se incubó a 60°C por 30 min con agitación continua. Se ajustó el pH a 4 con la muestra atemperada. Luego de ello se adicionaron 300  $\mu$ L de aminoglucosidasa y se incubó por 30 min a 60°C con agitación continua. Tras dicha incubación, se filtrará con papel filtro Whatman No. 4 y se realizarán dos lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C y 15 mL de etanol al 80 %. El papel filtro se dejará secar a 60°C por 24 horas y se registrará el peso obtenido. La diferencia de peso entre el papel filtro se atribuirá como la fracción de fibra insoluble obtenida.

#### 5.2.3.2 Fibra soluble

Basado en el método de determinación de fibra insoluble de Shiga *et al.* (2004), el residuo obtenido en el inciso anterior (IV.4.2.2.5.2) se conservó y se filtró nuevamente, adicionando un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó reposar por 12 horas. Después, se filtró con papel filtro Whatman No. 42 previamente pesado y

se realizaron dos lavados con 15 mL de etanol al 80 % y dos con 15 mL de acetona. Finalmente, se dejó secar el papel filtro durante 24 horas a 60 °C y se registró su peso. La diferencia de pesos se interpretó como la fracción de fibra soluble.

#### 5.2.3.3 Cuantificación de almidón resistente

El porcentaje de almidón resistente en las muestras fue calculado de acuerdo a lo sugerido por Saura-Calixto *et al.* (1993), mediante una digestión enzimática. A 100 mg de fibra insoluble se les adicionaron 6 mL de solución de KOH (2M) con agitación continua por 30 minutos a una temperatura de 25°C. Al término, se añadieron 3 mL de solución amortiguadora de acetatos (0.4 M, pH 4.75) y 5 mL de HCl (2N). El pH se ajustó a 4.74 y posteriormente se adicionaron 60 µL de aminoglucosidasa y las muestras fueron incubadas por 30 min a 60°C en baño María con agitación continua.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 g por 15 minutos en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y se recolectó el sobrenadante. El residuo remanente fue resuspendido con 10 mL de agua destilada y se repitió la centrifugación. Al sobrenadante se le cuantificó glucosa con el kit de glucosa oxidasa/peroxidasa.

### 5.3 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Se simuló el proceso digestivo del frijol Bayo Madero cocido, desde la boca hasta su fermentación en el colón. Se siguieron las técnicas adaptadas y modificadas por Campos-Vega *et al.* (2015; 2009).

#### 5.3.1 Simulación de las condiciones de la boca

Se reunieron 2 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 de frijol se les pidió enjuagarse la boca con agua. Los dos 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 segundos 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.

### 5.3.2 Simulación de las condiciones del estómago

Se tomaron 10 mL de la suspensión anterior, se ajustó el pH a 2 con HCl 2 N. A cada muestra se le añadió pepsina (0.055 g), disuelta en 0.94 mL de HCl 20 mM. Con esta mezcla se simulaban los fluidos gástricos, y se incubaron con agitación constante por 2 h a 37 °C.

### 5.3.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Se preparó un extracto intestinal sintético diluyendo 3 mg de hiel de Buey y 2.6 mg de pancreatina en 5 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer [conteniendo 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8 (preparándose 30 min antes de utilizarse)]. Se agregaron 5 mL de del extracto intestinal a cada muestra y al blanco; se ajustó el pH entre 7.2 y 7.4 con NaOH 2M y se transfirió a un recipiente que contenía el saco intestinal invertido, y se incubó con agitación constante por 2 h a 37 °C.

#### 5.3.4 Técnica del saco intestinal invertido de rata

El saco se preparó siguiendo la metodología descrita por Campos-Vega *et al.* (2015).

#### 5.3.5 Manejo de animales

Se utilizaron catorce ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g, clínicamente sanas. Las ratas se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (Campus Juriquilla). Se alojaron dos ratas por jaula de acero inoxidable (187 cm de ancho por 18 cm de alto) que permite la entrada de aire y luz. Las ratas igualmente fueron mantenidas bajo condiciones controladas de humedad ( $50 \pm 10 \%$ ), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-Z00-1999). Fueron alimentadas con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable *ad libitum*. Dieciséis horas antes del sacrificio, se les retiró el alimento, dejándoles únicamente el agua, para que presentaran un ayuno de 16 h.

#### 5.3.6 Sacrificio de animales y preparación del saco intestinal invertido

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital, cuando el animal estaba perfectamente anestesiado, se realizó un corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica con tijeras quirúrgicas esterilizadas (en acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999, punto 9). 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 fue escindido y colocado inmediatamente en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificada con  $\text{CO}_2$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 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 KrebsRinger (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 (CO<sub>2</sub>) (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 denominaron fracción no digerible (FND) (lado apical, AP), la cual posteriormente se sometió a una fermentación colónica *in vitro*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 5.3.7 Manejo de los animales después del sacrificio

Debido a que el interés para este estudio fueron sólo usar los intestinos 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 que se utilizó se remojó con cloro por 12 h, después se lavó y esterilizó para su posterior almacenamiento.

### 5.3.8 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 tres experimentos

independientes, en donde se empleó la rafinosa (100 mg) como control positivo de 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 un individuo voluntario sano 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 (H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>: 10:10:80, volumen) durante 30 min. El inóculo fecal (1 g de materia fresca) se homogenizó 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 0.07 g de la FND insoluble y 0.07 mL de la FND soluble de la muestra de frijol; con excepción del control negativo, al cual se le adicionó 0.140 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 determinaron a las 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. El sobrenadante fue considerado el extracto de la fermentación (EF).

## 5.4 Potencial nutracéutico

El potencial nutracéutico incluye la determinación de compuestos fenólicos, oligosacáridos, ácidos grasos de cadena corta y la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico del frijol cocido liofilizado (FCL), de los extractos de la fracción no digerible (FND), así como los extractos de la fermentación colónica. Cada extracto se analizó con su blanco correspondiente.

### 5.4.1 Determinación de compuestos fenólicos

#### 5.4.1.1 Extracción metanólica

La extracción de compuestos fenólicos del frijol cocido liofilizado (FCL) se llevó a cabo con el método descrito por Cardador-Martínez *et al.* (2002a). Brevemente, se adicionaron 10 mL de metanol a 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.

#### 5.4.1.2 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), 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  $\mu$ m). La columna se controló con termostato a 35 °C  $\pm$  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. Se inyectó un volumen de 20 µL 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.

#### 5.4.1.3 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 °C ± 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 analizarán por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo usando método estándar externo con estándares comerciales de los ácidos 3,4-

dihidroxifenilacético, 3-hidroxifenilacético, 3,4dihidroxihipocinámico y 3-hidroxibenzoico. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  del estándar/g muestra seca).

#### 5.4.2 Análisis y Cuantificación de Oligosacáridos por HPLC

Para la extracción de oligosacáridos se siguió la metodología descrita por Díaz-Batalla *et al.*, (2006), consistente en la colocación en baño María a 80 °C una solución compuesta de 0.5 g de muestra a analizar disuelta en 10 mL de agua destilada, durante una hora con agitación continua. Terminado el tiempo, la solución se atemperó hasta la temperatura ambiente.

Para la identificación y cuantificación de oligosacáridos en HPLC se siguió la metodología descrita por Muzquiz *et al.* (1999) donde el extracto de oligosacáridos fue inyectado en un HPLC acoplado a índice de refracción (IR) con las siguientes condiciones: volumen de muestra de 20  $\mu\text{L}$ , velocidad de flujo de 1 mL/min, fase móvil de acetonitrilo-agua 50:50 y fase estacionaria de columna ZORBAX 4.6 x 250 mm y 5 micras de tamaño de partícula. Los estándares que se utilizaron para la identificación y cuantificación mediante el uso de curva de calibración de oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa).

#### 5.4.3 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Se realizó microextracción en fase sólida de las muestras (SPME) con análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de acuerdo a la metodología por Zamora-Gasca *et al.* (2015). Las muestras se centrifugaron (Hermle Z 323 K; Wehinger, Alemania) a 3500 x g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante de 500 mg se pesaron en un vial 20 mL que se taparon y se colocaron en un automuestreador Gerstel MPS2. Se utilizó una fibra de 2 cm de polidimetilsiloxan-divinilbencen-carboxano para la microextracción en fase sólida

(SPME) donde las condiciones de extracción fueron las siguientes: temperatura de extracción de 45°C, tiempo de incubación de 5 min, velocidad de agitación de 250 rpm por 120 min de extracción, se utilizó una temperatura de desorción de 240°C durante 10 min.

Las muestras se analizaron en un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-MS) Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) equipado con un detector selectivo de masas Agilent 597C VL y un automuestreador de usos múltiples MPS2 XL (Gerstel). La separación de las muestras en el CG se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS (60 m x 250 µm x 0.25 µm; Agilent) utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La inyección se llevó a cabo a una temperatura de 250°C y el origen del espectrómetro de masas y cuadrupolo se mantuvo a 230°C y 150°C respectivamente. El inyector se utilizó en un modo sin división. La temperatura del horno se inició a los 40°C durante 5 min y se programó a 5°C/min desde 40 a 200°C, se mantuvo a 200°C durante 2 min, luego se programó a 20°C/min hasta 230°C y se mantuvo durante 15 min. La cuantificación de las muestras se obtuvo a través de curvas de calibración de los ácidos acético, propiónico y butírico.

#### 5.4.4 Evaluación de capacidad antioxidante

##### 5.4.4.1 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 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 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  $\mu\text{L}$  del radical ABTS a 20  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox/g de muestra ( $\mu\text{mol TEAC/g}$  de muestra). Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inibición} = \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

#### 5.4.4.2 DPPH

La determinación se llevó a cabo por la técnica propuesta por Fukumoto y Mazza (2000), adaptado a microplaca. Se añadió 20  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico y 200  $\mu\text{L}$  de solución DPPH en una microplaca. Asimismo, se añadió 20  $\mu\text{L}$  de metanol y 200  $\mu\text{L}$  de DPPH para la solución control. Las muestras se prepararon por triplicado y la lectura se realizó cada 10 minutos durante 90 minutos a una longitud de onda de 540 nm en un lector de Elisa (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices). Por medio de la ecuación de Burda y Oleszek (2001), la actividad antiradical o antioxidante fue calculada como el porcentaje de decoloración de DPPH siguiendo la ecuación mostrada a continuación:

$$\% \text{ Actividad antiradical} = \frac{\text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia Control}} * 100$$

## 5.5 Cálculos

### 5.5.1 Coeficiente de permeabilidad aparente (CP o $P_{app}$ ), Coeficiente de permeabilidad neta ( $CP_{neta}$ o $P_{app\ neta}$ ) y Relación de Flujo de Salida

El coeficiente de permeabilidad aparente (CP o  $P_{app}$ ) se calculó utilizando la siguiente ecuación (Lassoued *et al.*, 2011):

$$P_{app} = \frac{V}{A \cdot t} \cdot \left( \frac{C_f}{C_0} \right)$$

Donde  $V$  es el volumen del contenido serosal (dentro del saco intestinal),  $A$  es el área o superficie del segmento intestinal (calculada por la ecuación  $A=2\pi rh$ , siendo  $r$  el radio del segmento intestinal y  $h$  es la longitud del segmento intestinal disponible para la permeación),  $t$  es el tiempo de incubación,  $C_0$  es la concentración inicial en el lado de la mucosa (fuera del saco intestinal, es decir, la concentración del metabolito a calcular que provenía de la fase estomacal) y  $C_f$  es la concentración en el lado serosal luego de un tiempo determinado (en minutos).

El coeficiente de permeabilidad neta ( $CP_{neta}$  o  $P_{app\ net}$ ) fue calculado de la siguiente forma (Lassoued *et al.*, 2011; Wahlang *et al.*, 2011):

$$P_{app\ net} = P_{app} (BL \cdot AP) - P_{app} (AP \cdot BL)$$

Donde  $P_{app} (BL \cdot AP)$  es el coeficiente de permeabilidad aparente del lado basolateral hacia el lado apical y  $P_{app} (AP \cdot BL)$  es el coeficiente de permeabilidad aparente del lado apical hacia el basolateral.

La relación de flujo de salida se calculó utilizando la siguiente ecuación (Lassoued *et al.*, 2011; Wahlang *et al.*, 2011):

$$Flujo\ de\ Salida = \frac{P_{app} (BL \cdot AP)}{P_{app} (AP \cdot BL)}$$

### 5.5.2 Flujo de Agua (FA)

El flujo de agua fue calculado mediante la siguiente ecuación (Khemiss *et al.*, 2009):

$$FA = \frac{W_3 - W_2}{W_1}$$

Donde  $W_3$  representa el peso del segmento intestinal lleno luego del período respectivo de incubación,  $W_2$  es el peso del segmento intestinal antes de realizar la incubación y  $W_1$  es el peso inicial del segmento intestinal (vacío).

### 5.5.3 Viabilidad y cuantificación de absorción de glucosa del intestino

Se determinó la absorción de glucosa al interior de los sacos intestinales invertidos siguiendo la metodología de Li *et al.*, (2011). Brevemente, al intestino invertido y ligado por un extremo se le introdujeron 2 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer sin glucosa y se ligó por el otro extremo para crear el saco; el cual, fue sumergido en 16 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer con glucosa. Lo anterior se incubó en agitación continua durante 15, 30, 60 y 120 min, en baño a 37 °C, en atmósfera anaerobia (CO<sub>2</sub>). La concentración de glucosa se cuantificó usando el kit de glucosa oxidasa y peroxidasa. Los valores fueron comparados contra una curva de calibración usando glucosa (0-140 µg/mL) como estándar. Los resultados fueron expresados como relación del lado basolateral con el lado apical por tiempo.

## 5.6 Ensayo biológico

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

### 5.6.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de macrófagos murino RAW 264.7. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 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 cambió por medio fresco, hasta alcanzar la confluencia. Las células se incubaron en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C en una incubadora Thermo SCIENTIFIC 3100, y se manejaron en una cámara de bioseguridad (NuAire).

#### 5.6.1.1 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 264.7 se sembraron en placas de 96 pozos (1 x 10<sup>4</sup> 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 incubaron 24 h a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo el medio fue sustituido por 200 µL de las diferentes concentraciones del tratamiento (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 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 contenían lipopolisacáridos (1 µg/mL). Para este procedimiento se trabajó 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 con 0.5 % ASB.

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 realizaron por duplicado para su evaluación estadística.

#### 5.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (ON)

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos con  $2 \times 10^5$  células/pozo y se incubaron por 24 h para su adherencia. Después, el medio fue desechado y remplazado por medio fresco (DMEM, sin suero fetal bovino), conteniendo las diferentes concentraciones del tratamiento, y agregando a cada solución los lipopolisacáridos (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para llevar a cabo la activación de los macrófagos. Después de 24 h de incubación, se recolectaron 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo y se pasaron a otra placa de 96 pozos, a los cuales se les agregó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess (igual volumen de 1 % de sulfamida disuelta en 5 % de ácido fosfórico y 0.1 % de N-(1Naftil) 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  $\text{NaNO}_2$  (García-Lafuente *et al.*, 2014). Los experimentos se hicieron por duplicado para su evaluación estadística.

### 5.6.3 Cuantificación de marcadores de inflamación celular por medio de la técnica de inmunoensayo

Se utilizó el kit de detección de citocinas y quimosinas Mouse Cytokine Antibody Array (R&D Systems) Panel A (# ARY006), utilizado para la identificación simultánea de los niveles relativos de más de 40 citocinas y quimiocinas diferentes en una misma muestra. Para ello, se sembraron dos cajas, de 100 mm, con células RAW 264.7 ( $\rho$ :  $5 \times 10^5$  células/pozo). Una vez se adherieron las células y llegaron a confluencia del 70 al 80 %, en una de cajas se colocó el tratamiento (adición del EF de la FND de frijol en la concentración determinada por el  $IC_{50}$  y LPS) y en la otra se colocó el control positivo (macrófagos RAW 264.7 estimulados únicamente con LPS) por un tiempo de 24 horas.

La concentración de LPS fue de 1  $\mu\text{g/mL}$ . Luego de las 24 horas, se cosecharon las células de la siguiente forma: se les retiró el medio y se les añadió PBS 1X para lavarlas (5 mL), y se aspiró el PBS de lavado. Posteriormente se les añadió Buffer de lisis con inhibidores de proteasas, se dejó incubar por 30 min a 4°C. Se recuperó el líquido y fue transferido a tubos estériles, se sometieron a sonicación por 1 min, se dejó reposar por 10 s y nuevamente se sonicaron por 1 min. Finalizado esto, las muestras se centrifugaron a 14,000 g por 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga estéril. A dicho sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas por el método BCA puesto que el de Bradford interfiere con la lectura debido a la concentración de detergente presente en la solución amortiguadora de lisis. Luego de ello, se utilizó el kit para la detección de las diferentes proteínas, por inmunoensayo.

#### 5.6.3.1 Preparación de solución amortiguadora de lisis

Para la utilización del kit Mouse Cytokine Antibody Array (R&D Systems) se requirió una mezcla de inhibidores: aprotinin, leupeptin y pepstatin en concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales fueron adquiridos a través del cóctel Halt Protease Inhibitor

Cocktail 100X (Life Technologies). La ficha técnica de la solución amortiguadora indica que contiene 800 nM de Aprotinin (5.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 20  $\mu\text{M}$  de Leupeptin (8.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 10  $\mu\text{M}$  de Pepstatin A (6.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Teniendo en cuenta la menor concentración (Aprotinin), se procedió a calcular la cantidad de mezcla de inhibidores que debía ser aforada con solución amortiguadora de lisis.

#### 5.6.3.2 Cuantificación de proteínas por el método BCA

Para este ensayo se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Life Technologies) el cual contiene los reactivos A (BCA Reagent A, 500 mL) y B (BCA Reagent B, 25 mL) los cuales deben prepararse en una concentración de reactivo A/reactivo B de 50:1. Para la construcción de la curva de calibración se empleó el estándar de albumina incluido en el kit con 2 mg/mL. La curva de calibración se realizó en una caja de 96 pozos, siendo incubada a 37 °C por 30 min y midiendo su absorbancia pasado dicho tiempo a 562 nm. El blanco consistió en 25  $\mu\text{L}$  de agua destilada con 200  $\mu\text{L}$  del reactivo BCA. Sobre esta curva se midió la absorbancia del aislado proteico obtenido para cuantificar la cantidad de proteínas.

#### 5.7 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 utilizó la prueba de Dunnet. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico JMP 8.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Composición química

Los resultados del análisis proximal del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedad Bayo Madero, liofilizado de la cosecha 2015 se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Contenido proximal de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

Muestra	Proteína	Lípidos	Cenizas	Carbohidratos <sup>1</sup>
FCL15	18.87 ± 0.04	1.67 ± 0.06	4.76 ± 0.02	74.70 ± 0.07

FCL15= Frijol cocido liofilizado, cosecha 2015. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes, expresados en porcentaje (datos en base seca).

<sup>1</sup>Calculados por diferencia.

Estos resultados del frijol cosecha 2015 son similares a los valores del frijol de la misma variedad, pero de cosecha 2013, existiendo algunas variaciones, con valores de 20.65, 2.04, 4.56 y 72.75 % de proteína, lípidos, cenizas y carbohidratos respectivamente (Islas-Gómez, 2015). Estos valores también entran dentro de los intervalos reportados por otros autores en cuanto a la composición química del frijol común (Paredes-López *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2016).

El contenido de carbohidratos en la muestra fue de 74.70 %, que fue 1.95 % mayor al de la cosecha 2013. Así mismo, este valor es mayor en un 3.41 % a lo reportado por Treviño-Mejía *et al.* (2016) para harina de frijol. Este valor entra dentro de los intervalos reportados de carbohidratos para el frijol común que va de un 52 a un 76 % (Paredes-López *et al.*, 2006; Barampama y Simard, 1993; Sotelo *et al.*, 1995; Romero-Arenas *et al.*, 2013).

En cuanto al valor de proteína de 18.87 % este fue menor a lo reportado en el frijol cosecha 2013. Respecto al contenido de proteína en frijol cocido por otros autores, los valores encontrados son menores en un 10.78 % a los reportados por Cuéllar-

Núñez (2015) y en 1.83 % a lo reportado por Treviño-Mejía *et al.* (2016), pero son mayores en un 2.67 % a lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2009). Estas diferencias podrían deberse al proceso de lixiviación de proteínas solubles (Mgdi, A. O. 2007), a factores ambientales (Le Bourvellec *et al.*, 2015) o a factores genéticos ya que se ha relacionado el tamaño del grano con la cantidad de proteína en éste (Shellie-Dessert y Bliss, 1991; Guzmán-Maldonado *et al.*, 2000). De igual manera, entra dentro de los intervalos reportados por otros autores para diferentes variedades de frijol común que va de 16.7 a 27.2 g/100 g (Baptista *et al.*, 2016).

El contenido de lípidos fue de 1.67 %, valor que se encuentra por debajo en un 0.37 % respecto a lo presentado en la cosecha 2015 y en un 1.18% comparado a la harina de frijol reportado por Treviño-Mejía *et al.* (2016); aunque la cuantificación presentada se encuentra por arriba en un 0.77% con respecto a lo encontrado por Campos-Vega *et al.* (2009), para la misma variedad de frijol. Igualmente encontrándose dentro del intervalo que va de 1.5 to 2.9 g/100 g (Baptista *et al.*, 2016). El bajo contenido de lípidos, pero de alta calidad como ácidos grasos insaturados como los esenciales (linoleico y linolénico), están asociados a numerosos beneficios a la salud (Mudryj *et al.*, 2014).

En cenizas el contenido de 4.75 % es ligeramente mayor al de la cosecha 2013, así como a lo reportado por Campos-Vega *et al.*, (2009) con un valor de 3.71 % y es ligeramente menor en un 0.41 % a lo reportado por Treviño-García *et al.* (2016).

En términos generales estas variaciones en la composición química del frijol pueden atribuirse a las diferentes condiciones de los años de cultivo, debido a las diferentes condiciones a las que se somete la planta, ya sean por sitio de producción, clima u otros factores (Le Bourvellec *et al.*, 2015).

## 6.2 Contenido de fibra insoluble, soluble y almidón resistente.

El contenido de fibra total (soluble e insoluble) así como el contenido de almidón resistente en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedad Bayo Madero se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Contenido de fibra total, soluble e insoluble y almidón resistente en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedad Bayo Madero.

	<b>Fibra Total</b>	<b>Fibra Insoluble</b>	<b>Fibra Soluble</b>	<b>Almidón Resistente</b>
<b>FCL</b>	59.44 ± 0.85	56.62 ± 0.22	2.82 ± 1.07	24.57 ± 0.13

Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes, expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca y ajustado a contenido de carbohidratos. FCL= Frijol Cocido Liofilizado.

El contenido de fibra total ajustado al porcentaje de carbohidratos presentes en el frijol fue de 59.44 %. Se han reportado valores para distintas variedades de frijol común que van de 36.5-58.57 % siendo el de la misma variedad (Bayo Madero) de 55% (Campo-Vega *et al.*, 2009; Cruz-Bravo *et al.*, 2011).

El valor de fibra insoluble fue de 56.62%, valor mayor al reportado por Campos-Vega *et al.* (2009); para la misma variedad de frijol que fue de 41%, aunque entra dentro del intervalo reportado para distintas variedades de frijol que va de 31-61.8 % (Campo-Vega *et al.*, 2009; Cruz-Bravo *et al.*, 2011; Feregrino-Pérez *et al.*, 2014). El aumento de la fibra insoluble se pudiera deber a la formación de almidón resistente retrogradado (Peñalver *et al.*, 2007).

Entre los efectos benéficos de la fibra insoluble está el aumento del volumen fecal que conlleva a una mejor acción de arrastre, mejorando el tiempo de tránsito intestinal y con efecto laxante, reduciendo la absorción de lípidos (Cummings, 2001; Tosh y Yada 2010; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2015).

Para fibra soluble el contenido fue de 2.82%, valor que entra dentro de lo reportado que va de 0.7-14 para la misma variedad de frijol utilizado (Campo-Vega *et al.*, 2009;

Vergara-Castañeda *et al.*, 2010). De igual manera, se asemeja a lo cuantificado por Sandoval-Peraza *et al.* (2014) con un valor de 2.6 g por 100 g de una fracción rica en fibra de de frijol fresco de frijol común negro var. Jamapa. Dentro de los carbohidratos solubles se encuentran los  $\alpha$ -galactósidos, los cuales son oligosacáridos de la familia de las rafinosas como lo son la estaquiosa y verbascosa (Singh *et al.*, 2016).

La fibra soluble tiene propiedades fisicoquímicas (capacidad de unión al agua y capacidad de hinchamiento) y de fermentabilidad (AGCC) que pudieran tener efecto sobre la ingesta de alimentos, patrón de comida y comportamiento de alimentación en ratas (Tan *et al.*, 2016).

El valor encontrado de almidón resistente fue de 24.57 %, este valor fue 12.43 % menor al reportado por Campo-Vega *et al.* (2009) para la misma variedad de frijol.

Este almidón resistente funciona como prebiótico y promueve el crecimiento de probióticos en el intestino. Su fermentación produce mayor cantidad de ácido butírico comparado con otros carbohidratos (Singh *et al.*, 2016).

Estas diferencias encontradas pueden ser atribuidas a factores ambientales ya que, al ser distintas cosechas, los factores a los que las plantas se expusieron son distintos (Hacisalihoglu *et al.*, 2009).

### 6.3 Contenido de compuestos fenólicos libres en el extracto metanólico y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

Se ha sugerido que las interacciones con otros compuestos de la matriz alimentaria pueden influenciar y alterar la estabilidad de compuestos fenólicos durante la digestión (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). Se ha relacionado la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos a las propiedades químicas y morfológicas de la fibra del alimento (Gouw *et al.*, 2017). Los beneficios a la salud de estos compuestos bioactivos dependen no sólo de la ingesta sino también de su biodisponibilidad, y para conocer ésta, es primordial determinar su bioaccesibilidad, donde los métodos

*in vitro* para simular la digestión gastrointestinal nos permiten conocerla (Cilla *et al.*, 2017). Por lo que es importante estudiar éstas interacciones y así conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de diferentes compuestos en el alimento.

En este sentido, la bioaccesibilidad es la cantidad del componente de cualquier alimento que puede ser liberada de la matriz alimentaria, que es detectable en los intestinos, y que pudiera pasar la barrera intestinal (Palafox-Carlos *et al.*, 2012).

La biodisponibilidad se define como la fracción del nutriente ingerido o compuesto que alcanza la circulación sistémica y los sitios específicos donde puede ejercer su acción biológica, ésta depende de la correcta absorción, la liberación de una forma dosificada y la eliminación pre-sistémica (Chen *et al.*, 2001).

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la cuantificación de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD del extracto metanólico y durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

**Cuadro 5.** Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos libres de la digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

	Ác. gálico	Ác. clorogénico	(+)-Catequina	Ác. caféico
<b>EM</b>	44.27 ± 2.69 <sup>d</sup>	189.32 ± 26.61 <sup>c</sup>	280.30 ± 25.83 <sup>ab</sup>	17.06 ± 6.29 <sup>c</sup>
<b>BOCA</b>	127.77 ± 18.70 <sup>cd</sup>	195.18 ± 4.43 <sup>bc</sup>	170.26 ± 3.29 <sup>b</sup>	14.93 ± 0.24 <sup>c</sup>
<b>ESTÓMAGO</b>	268.50 ± 28.55 <sup>b</sup>	644.20 ± 107.40 <sup>a</sup>	565.39 ± 152.98 <sup>a</sup>	105.79 ± 0.93 <sup>a</sup>
<b>FND</b>				
<b>15 min</b>	142.51 ± 32.85 <sup>c</sup>	345.91 ± 62.77 <sup>b</sup>	414.49 ± 31.12 <sup>ab</sup>	13.82 ± 0.67 <sup>c</sup>
<b>30 min</b>	168.86 ± 68.89 <sup>bc</sup>	197.92 ± 26.30 <sup>bc</sup>	101.87 ± 51.19 <sup>b</sup>	12.11 ± 1.80 <sup>c</sup>
<b>60 min</b>	201.08 ± 62.9 <sup>4bc</sup>	214.29 ± 82.85 <sup>bc</sup>	ND	10.46 ± 0.34 <sup>c</sup>
<b>120 min</b>	ND	243.48 ± 125.65 <sup>bc</sup>	ND	10.53 ± 0.45 <sup>c</sup>
<b>EFFND</b>				
<b>6 h</b>	107.69 ± 43.65 <sup>cd</sup>	93.22 ± 6.23 <sup>c</sup>	ND	ND
<b>12 h</b>	930.41 ± 27.02 <sup>a</sup>	ND	452.51 ± 67.91 <sup>ab</sup>	83.63 ± 20.32 <sup>b</sup>
<b>24 h</b>	178.67 ± 2.04 <sup>bc</sup>	ND	ND	93.78 ± 0.95 <sup>ab</sup>

Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. Datos expresados en µg/g de muestra. EM= Extracto metanólico. FD= Fracción Digerible. FND= Fracción No Digerible. EFFND= Extracto Fermentado de la Fracción No Digerible. Diferentes letras expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Para los valores en el extracto metanólico (EM), el contenido de ácido gálico obtenido fue de 44.27 µg/g muestra seca, ligeramente más alto a lo reportado por Xu y Chang (2009), con un valor de 34.42 µg/g muestra seca. El ácido clorogénico con un valor de 189.32 µg/g se encuentra dentro de los intervalos reportados para la misma variedad de frijol, pero de distintos años de cosecha, que va de 49.4-227.99 µg/g muestra seca (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014). El valor de catequina de 280 µg/g se encuentra ligeramente por debajo a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2014) sin embargo, lo obtenido se encuentra dentro de lo reportado para frijol

común por otros autores 76.25-126.1  $\mu\text{g}$  de (+)-catequina /g muestra seca (Xu y Chang, 2009; Aguilera *et al.*, 2011). El ácido caféico con 17.06  $\mu\text{g/g}$  igualmente se encuentra dentro de lo reportado 5.08-18.94  $\mu\text{g/g}$  muestra seca (Xu y Chang, 2009; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014).

En las diferentes etapas de la digestión se puede observar que la mayor cuantificación de estos compuestos está en la etapa de estómago. Diferentes estudios han encontrado mayor concentración de polifenoles en condiciones gástricas, mientras que en la fracción duodenal se disminuyó el contenido de polifenoles (Vallejo *et al.*, 2004; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). Esto pudiera ser debido a la hidrólisis de algunos compuestos fenólicos unidos a algún otro componente de la matriz alimentaria como proteínas y/o carbohidratos dado principalmente por el pH ácido y la actividad enzimática durante esta etapa digestiva (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Saura-Calixto *et al.*, 2007; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). La posterior disminución de la bioaccesibilidad de éstas podría ser el cambio en el pH de condiciones gástricas ácidas a alcalinas en el intestino, ya que las antocianinas, por ejemplo, son altamente inestables a pH intestinal (Tagliacucchi *et al.*, 2010) y también las sales biliares podrían contribuir a la disminución en su cuantificación (Vallejo *et al.*, 2004).

Es importante señalar que una importante cantidad de estos compuestos se pudo detectar en el extracto de fermentación, lo que sugiere la liberación de los compuestos de la matriz alimentaria por microbiota en el colon (Saura-Calixto *et al.*, 2010).

Para ácido gálico su mayor contenido fue en el extracto de fermentación de 12 horas. Esto pudiera deberse a su liberación de la matriz alimentaria (Saura-Calixto *et al.*, 2010) y a hidrólisis de taninos presentes en el frijol común. Mosele *et al.* (2015) atribuyen el aumento de componentes monoméricos como el ácido gálico en la fermentación colónica *in vitro* de un extracto de té negro y de productos de granada a la hidrólisis de taninos.

Referente al ácido clorogénico, no se detectó en los tiempos de fermentación de 12 y 24 h, esto puede deberse a que este ácido tiene un metabolismo rápido de 4 h de fermentación por la microbiota fecal, tardando alrededor de 24 h en quedar completamente degradado, algunos de sus productos de fermentación son el ácido caféico y otros metabolitos como ácido dihidrocafónico y ácido dihidroferúlico (Rechner *et al.*, 2004 y Mills *et al.*, 2015), lo que explicaría el incremento del ácido caféico encontrado en estas mismas horas de fermentación.

La biodisponibilidad está afectada por varios factores como la bioaccesibilidad, efecto de la matriz alimentaria, transportadores, estructuras moleculares y enzimas metabólicas (Rein *et al.*, 2013), por lo que se llevó a cabo la medición de la biodisponibilidad de compuestos fenólicos cuantificando su contenido dentro de sacos intestinales de rata invertidos.

En el Cuadro 6 se muestran los contenidos de compuestos fenólicos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero, en la fracción biodisponible.

**Cuadro 6.** Contenido de compuestos fenólicos libres de la digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero, en la fracción biodisponible.

Tiempos de incubación	Ác. gálico	Ác. clorogénico	Ác. caféico
<b>FD</b>			
<b>15 min</b>	185.36 ± 5.12 <sup>a</sup>	107.00 ± 1.37 <sup>d</sup>	ND
<b>30 min</b>	191.59 ± 9.61 <sup>a</sup>	130.71 ± 3.63 <sup>c</sup>	ND
<b>60 min</b>	134.26 ± 5.51 <sup>b</sup>	182.90 ± 0.90 <sup>b</sup>	ND
<b>120 min</b>	21.94 ± 4.24 <sup>c</sup>	319.90 ± 4.72 <sup>a</sup>	40.05 ± 1.05 <sup>a</sup>

Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. Datos expresados en µg/g de muestra. FD=Fracción Digerible. Diferentes letras expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Para ácido gálico la mayor cantidad se encontró a los 30 min de incubación, con una absorción de 48.79 %. Mientras que para ácido caféico la biodisponibilidad o

permeabilidad fue hasta los 120 min de incubación, con un porcentaje de absorción de 74.34 %, estos valores de ambos ácidos son mayores a lo encontrado para la misma matriz alimentaria reportados por Islas-Gómez (2015) con 34.37 y 26.86 % respectivamente.

Para ácido clorogénico, se obtuvo una mayor biodisponibilidad a los 120 min, con un 51.95 %. Para otra matriz alimentaria que fue totopo de maíz y frijol se reporta una absorción de este compuesto de 33.15% (Luzardo-Ocampo, 2016). El ácido clorogénico y sus derivados flavan-3-oles se han encontrado excretados en la orina en cantidades correspondientes al 29% después de la ingesta de café y hasta aproximadamente 83 % después de la ingesta de té verde (Del Rio *et al.*, 2010).

Estas diferencias encontradas en los valores mayores en cuanto a absorción pudieran ser explicadas por la viabilidad del intestino la cual se discute posteriormente.

También se evaluó el transporte de compuestos fenólicos por medio de los coeficientes de permeabilidad aparente, permeabilidad neta y relación de flujo, ya que se han relacionado con la biodisponibilidad de compuestos, éstos se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y relación de flujo de compuestos fenólicos de frijol común.

Compuesto fenólico	Tiempo de incubación <sup>1</sup>	AP → BL <sup>2</sup> $P_{app}$ (x 10 <sup>-4</sup> )	BL → AP <sup>2</sup> $P_{app}$ (x 10 <sup>-4</sup> )	$P_{app}$ neta <sup>2</sup> (x 10 <sup>-3</sup> )	Relación de Flujo
<b>Ác. gálico</b>	15	0.67	1.03	0.36	1.54
	30	0.69	0.61	0.08	0.88
	60	0.24	0.36	0.12	1.50
	120	0.02	0	0.02	0
<b>Ác. clorogénico</b>	15	0.77	2.51	1.74	3.23
	30	0.47	0.72	0.25	1.51
	60	0.33	0.39	0.06	1.17
	120	0.29	0.22	0.07	0.76
<b>Ác. caféico</b>	15	0	0.10	-	0
	30	0	0.04	-	0
	60	0	0.02	-	0
	120	0.04	0.10	0.06	0.26

Datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de experimentos independientes. BL: Basolateral; AP: Apical. <sup>1</sup>Tiempo de incubación en minutos. <sup>2</sup>Coeficiente de permeabilidad aparente y neta calculados en cm/s.

Se obtuvo una absorción alta de compuestos fenólicos del frijol común a través de los sacos intestinales (A→B) ya que se presentaron valores mayores a  $1 \times 10^{-6}$  cm/s que es considerado como una alta permeabilidad (Artursson *et al.*, 2001).

También se ha clasificado esta permeabilidad paralela en membranas artificiales clasificando los compuestos en buena absorción ( $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$  cm/s), moderada absorción ( $P_{app} = 5-10 \times 10^{-6}$  cm/s) o de baja absorción ( $P_{app} < 5 \times 10^{-6}$  cm/s) (Rastogi y Jana 2016), observándose también buena absorción tanto de ácido gálico como del clorogénico, y en el minuto 120 de incubación del ácido caféico. Esto difiere a lo encontrado por Rastogi y Jana (2016) quienes encuentran baja absorción de 6

compuestos fenólicos puros (ácido caféico, crisina, ácido gálico, quercetina, resveratrol y rutina) en ensayos de permeabilidad paralela de membrana artificial y en experimentos de permeabilidad bidireccional con células Caco-2. Jiamboonsri *et al.*, (2015) compararon coeficientes de permeabilidad de compuestos puros (CP), en mezcla (MZ) y en extracto de semilla de mango (ESM) encontrando mayor transporte de la siguiente manera ESM > MZ > CP. Estas diferencias encontradas en las permeabilidades sugieren que el aumento en la absorción de compuestos fenólicos pudiera deberse a que se encuentran dentro de una matriz alimentaria (Jiamboonsri *et al.*, 2015).

Valores mayores de  $P_{app}$  de ácido gálico y clorogénico se obtuvieron en los primeros tiempos de incubación (15 y 30 min). De manera general, los valores  $P_{app}$  fueron disminuyendo conforme al tiempo de incubación, comportamiento similar para fenoles totales, taninos condensados y flavonoides de café usado bajo una digestión gastrointestinal *in vitro* (Campos-Vega *et al.*, 2015). Se ha reportado que la absorción de polifenoles es relativamente baja, entre los compuestos con mayor absorción se encuentran las isoflavonas y ácido gálico, seguido de catequina (Manach *et al.*, 2005). También se ha observado que la absorción depende de la dosis, específicamente, el ácido clorogénico proveniente del café, tiene reducida biodisponibilidad en humanos cuando se ingiere en dosis altas (Stalmach *et al.*, 2014).

Los valores de relación de flujo menores de 2 y mayores de 0.5 sugieren que estos compuestos permean a través del intestino de forma pasiva a excepción del ácido clorogénico a los 15 min y de ácido caféico a los 120 min que nos habla de transporte activo como mecanismos de absorción (Hubatsch *et al.*, 2007). La difusión pasiva puede influir en la permeabilidad de los compuestos fenólicos de una manera muy compleja (Rastogi y Jana, 2016), ya que esta puede regirse por propiedades fisicoquímicas como la lipofiliidad, pKa, peso molecular y enlaces de hidrógeno (Refsgaard *et al.*, 2005).

6.4 Contenido de metabolitos de compuestos fenólicos en los distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) Variedad bayo madero.

El frijol común es fuente de proantocianidinas, éstas son de los compuestos fenólicos más abundantes de la dieta humana (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b; Gu *et al.*, 2004; Coutin *et al.*, 2017). Cabe destacar que éstas son poco absorbidas por lo que alcanzan el colon y son metabolizadas por la microbiota intestinal a ácidos fenólicos, incluyendo fenilpropiónicos, fenilacéticos y derivado de ácido benzoico (Monagas *et al.*, 2009), metabolitos que pudieran influenciar en la salud del huésped (Bode *et al.*, 2013).

En el cuadro 8 se presenta el contenido de metabolitos en distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la FND de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.

**Cuadro 8.** Contenido de metabolitos en distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro*.

Metabolitos	6 h	12 h	24 h
<b>3,4-dihidroxifenilacético</b>	1.95 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.23 ± 1.50 <sup>a</sup>	ND
<b>3-hidroxifenilacético</b>	14.07 ± 1.97 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>3,4-dihidroxihipocinámico</b>	318.16 ± 34.84 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>3-hidroxibenzoico</b>	ND	3.37 ± 1.76 <sup>a</sup>	ND

ND= No detectado. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. Datos expresados en µg/g de muestra. Diferentes letras expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey por renglón.

El perfil de metabolitos fue diferente en los distintos tiempos de fermentación. A las 6 horas de ésta, se encontraron 3,4-dihidroxihipocinámico, 3-hidroxifenilacético y 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC) con cantidades de 318.16, 14.07 y 1.95 µg/g, respectivamente. A las 12 horas de fermentación se encontraron 3-hidroxibenzoico con 3.37 µg/g y 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) con 3.23 µg/g. No se detectaron ninguno de los metabolitos estudiados a las 24 horas de fermentación.

Los metabolitos 3,4- dihidroxifenilacético así como 3-hidroxifenilacético se han encontrados en fermentación con microbiota fecal de diferentes flavonoides (rutina, isoquercetina y glucoronidos de quercetina) (Aura *et al.*, 2002). Así como 3-hidroxibenzoico se encontró en el tracto gastrointestinal de cerdos alimentados con frambuesas (Wu *et al.*, 2009).

Se conocen efectos apoptóticos del metabolito 3,4-dihidroxihipocinámico (Ogata *et al.*, 2000), potentes propiedades antioxidantes del DOPAC (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015; Raneva *et al.*, 2001), así como efecto antiinflamatorio al inhibir la secreción de citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS (Monagas *et al.*, 2009).

Las proantocianidias se habían considerado como antinutrias, sin embargo, es importante considerar las propiedades biológicas de estos metabolitos como antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras (Déprez *et al.*, 2000).

#### 6.5 Capacidad antioxidante del extracto metanólico y durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

En el Cuadro 9 se muestra la capacidad antioxidante del extracto metanólico, así como de las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

**Cuadro 9.** Capacidad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

	DPPH ( $\mu\text{mol TEAC/g muestra}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TEAC/g muestra}$ )
<b>EM</b>	3.56 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>	4.08 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
<b>BOCA</b>	5.93 $\pm$ 2.00 <sup>cd</sup>	2.11 $\pm$ 0.42 <sup>bc</sup>
<b>ESTÓMAGO</b>	3.93 $\pm$ 1.76 <sup>d</sup>	3.00 $\pm$ 0.88 <sup>bc</sup>
<b>FND</b>		
<b>15 min</b>	13.40 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 1.14 <sup>c</sup>
<b>30 min</b>	9.96 $\pm$ 1.98 <sup>ab</sup>	3.06 $\pm$ 1.30 <sup>bc</sup>
<b>60 min</b>	8.29 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup>	2.49 $\pm$ 1.75 <sup>bc</sup>
<b>120 min</b>	9.65 $\pm$ 2.29 <sup>ab</sup>	0.70 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>
<b>EFFND</b>		
<b>6 h</b>	5.10 $\pm$ 0.60 <sup>cd</sup>	4.14 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
<b>12 h</b>	7.66 $\pm$ 0.34 <sup>bc</sup>	4.25 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>
<b>24 h</b>	7.65 $\pm$ 2.53 <sup>bc</sup>	12.44 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>

Datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de experimentos independientes. EM= Extracto metanólico. FND= Fracción No Digerible. EFFND= Extracto Fermentado de la Fracción No Digerible. Datos expresados en  $\mu\text{g/g}$  de muestra. Diferentes letras expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Se puede observar que existen diferencias entre las diferentes determinaciones para DPPH y ABTS, esto puede explicarse por los diferentes radicales utilizados y por las diferentes afinidades que presentan los radicales, por ejemplo, el ABTS puede reaccionar con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Awika *et al.*, 2003).

El DPPH es altamente sensible, más que el ABTS, al entorno de reacción, como al agua y disolvente, pH, oxígeno y exposición a la luz (Xie y Schaich, 2014).

ABTS puede trabajar bien tanto en medios orgánicos como acuosos y su eficiencia depende del sistema de solvente empleado, a diferencia de DPPH. En comparación, la velocidad de reacción de DPPH es mucho menor (Awika *et al.*, 2003).

En los resultados se puede observar una mayor capacidad en etapas de intestino delgado para DPPH, así como una importante capacidad antioxidante en las etapas de fermentación para las dos determinaciones, este comportamiento es similar a lo encontrado por Islas-Gómez (2015) para la misma matriz alimentaria, donde reporta un incremento de la capacidad antioxidante en extractos de fermentación colónica así como con lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2015), pero utilizando como muestra café usado, que de igual manera fue sometido a una digestión gastrointestinal *in vitro*, este incremento en la capacidad antioxidante en etapas de fermentación colónica podría ser consecuencia de la liberación de determinados compuestos fenólicos en esta etapa.

La mayor capacidad antioxidante para ABTS se encuentra a las 24 horas de fermentación, esto pudiera deberse a la reacción con antioxidantes lipofílicos producidos por la microbiota que pudieran encontrarse en este extracto que no serían detectables para la determinación por DPPH.

De manera general, los ensayos de uso común no abordan las reacciones radicales en los lípidos, cuando los lípidos están implicados en la oxidación de las membranas y los alimentos (Schaich *et al.*, 2015).

#### 6.6 Flujo de agua y viabilidad en saco intestinal invertido durante ensayo de permeabilidad *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

Una vez que se extrae el intestino de la rata, este tiene un tiempo de vida por lo que se debe de usar lo antes posible antes de que pierda la viabilidad por completo. Para conocer que tan viable estaba el intestino, una manera de verificarlo es por el flujo de agua al interior de éste.

En el cuadro 10 se presenta el efecto del flujo de agua en el saco intestinal invertido tanto para la muestra como para el blanco de la digestión.

**Cuadro 10.** Flujo de agua en intestinos de ratas Wistar después de diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (min)	Blanco <sup>1</sup>	Muestra <sup>1</sup>
15	0.23 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	0.17 ± 0.09 <sup>Ba</sup>
30	0.33 ± 0.10 <sup>Aa</sup>	0.18 ± 0.4 <sup>ABb</sup>
60	0.36 ± 0.17 <sup>Aa</sup>	0.31 ± 0.13 <sup>ABa</sup>
120	0.37 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	0.32 ± 0.08 <sup>Aa</sup>

Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. El blanco corresponde a fluido salival sometido a digestión gastrointestinal *in vitro*. La muestra corresponde a frijol cocido liofilizado sometido a digestión gastrointestinal *in vitro* <sup>1</sup>Expresado en g agua/ g intestino fresco. Diferentes letras (mayúscula) en la misma columna expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la Prueba de Tukey para los diferentes tiempos de incubación. Diferentes letras (minúscula) en el mismo renglón expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la Prueba de Tukey para el mismo tiempo de incubación.

Hubo absorción de agua a través del intestino incrementando el flujo de agua conforme al tiempo, con diferencias significativas para la muestra entre el tiempo 15 y 120 min de incubación con valores de 0.17 y 0.32 g de agua/ g de intestino fresco, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos por Campos-Vega *et al.* (2015) para una matriz (café usado) en los mismos tiempos de incubación con valores que van entre los intervalos de 0.08-0.13 y 0.26 -0.43 g de agua/ g de intestino fresco respectivamente. Lo anterior demuestra que el intestino estaba viable.

Otra manera de conocer la viabilidad del intestino, fue por la cuantificación de glucosa al interior y fuera del saco intestinal.

En el Cuadro 11 se presenta el contenido de glucosa tanto en lado apical (fuera del saco), como del lado basolateral (dentro del saco).

**Cuadro 11.** Transporte de glucosa en un modelo de saco intestinal invertido.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Lado apical</b>	<b>Lado basolateral</b>	<b>Relación Basolateral/Apical</b>
<b>15</b>	53.49 ± 3.90 <sup>b</sup>	65.38 ± 3.96 <sup>c</sup>	1.22
<b>30</b>	55.30 ± 7.16 <sup>b</sup>	98.92 ± 1.86 <sup>a</sup>	1.79
<b>60</b>	49.03 ± 4.97 <sup>b</sup>	93.80 ± 19.01 <sup>ab</sup>	1.91
<b>120</b>	69.96 ± 11.77 <sup>a</sup>	76.87 ± 6.15 <sup>bc</sup>	1.09

Los resultados de los lados apical y basolateral son expresados como  $\mu\text{g}$  de glucosa /mL. Basolateral/Apical representan la relación del lado basolateral con el apical. Datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de experimentos independientes. Las letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) en la Prueba de Tukey.

Se puede observar transporte de glucosa al interior del saco intestinal invertido debido a la presencia de ésta en el lado basolateral. El contenido de glucosa fue aumentando conforme al tiempo, observándose una mayor absorción en el minuto 30 y 60 de incubación, sin diferencia significativa entre estos valores, aunque este valor disminuye ligeramente en el minuto 120 de incubación, aunque esta disminución no muestra diferencia significativa con el tiempo 60 y éste a su vez con el tiempo 30.

Esto difiere a lo encontrado por García-Gutiérrez, (2015) donde la mayor absorción de glucosa se obtuvo a los 15 min, disminuyendo el contenido conforme al tiempo.

Otro estudio donde se analiza la viabilidad e integridad de los sacos intestinales invertidos, muestran viabilidad de estos hasta el minuto 120 de incubación al encontrar incremento en las proporciones del contenido de glucosa en los lados seroso y mucoso de los sacos (Onnainty *et al.*, 2017).

Con estos resultados se puede concluir que el tejido de los intestinos utilizados estaba viable durante los ensayos *ex vivo* de permeabilidad ya que en los tiempos de incubación se observó un aumento en la absorción de glucosa, donde la ésta se concentrará en el lado basolateral, ya que se transporta de manera activa en sacos

intestinales saludables que son activos metabólicamente y que no presentan fugas (Ballent *et al.*, 2006).

La disminución en la absorción de glucosa en el tiempo 120 de incubación podría indicar la pérdida de viabilidad del intestino. Li *et al.* (2011) reportan un comportamiento similar en cuanto a la viabilidad y buen funcionamiento del intestino donde el aumento de la relación basolateral/apical se observa hasta los 60 minutos de incubación seguido de un decremento en el tiempo 120, sugiriendo que es en este tiempo en el que empieza a perder viabilidad el intestino. Aunque la estabilización de la absorción de glucosa en los intestinos, sin diferencias notorias estadísticamente en los tiempos 30, 60 y 120 min, podrían hablar de un proceso de sobresaturación (Chan *et al.*, 2006).

#### 6.7 Contenido de oligosacáridos en frijol cocido y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

El frijol común es fuente de oligosacáridos no digeribles, los cuales llegan hasta el colon ya que resisten la digestión del tracto gastrointestinal (Campos-Vega *et al.*, 2009). Se consideraban elementos indeseables ya que provocan flatulencia al llegar al colon donde pueden ser fermentados por microbiota produciendo AGCC (Campos-Vega *et al.*, 2009). Se les reconoce como prebiótico y se ha demostrado que efectúan cambios en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal trayendo beneficios a la salud (Collins y Rastall, 2008; Rastall, 2013; De Fátima *et al.*, 2005).

Algunos de los efectos benéficos de los oligosacáridos son la mejora en la respuesta del sistema inmune (Vulevic *et al.*, 2008), aumento en la producción de ácido butírico asociado a la inducción de apoptosis en células transformadas (Walton *et al.*, 2012) y disminuye factores de riesgo asociados a la obesidad, síndrome metabólico y cáncer de colon (Mussatto y Mancilha, 2007; Rastall, 2013; Johnson *et al.*, 2013).

En el cuadro 12 se presenta el contenido de oligosacáridos en el extracto de éstos, así como en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica de frijol común.

**Cuadro 12.** Contenido de oligosacáridos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

	Rafinosa <sup>1</sup>	Estaquiosa <sup>1</sup>	Verbascosa <sup>1</sup>
<b>FCL</b>	6.27 ± 1.01 <sup>b</sup>	39.79 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>Boca</b>	7.78 ± 1.62 <sup>b</sup>	28.72 ± 0.73 <sup>e</sup>	1.18 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>Estómago</b>	14.82 ± 0.76 <sup>a</sup>	33.75 ± 0.19 <sup>cd</sup>	1.36 ± 0.30 <sup>a</sup>
<b>Intestino delgado</b>			
<b>15 min</b>	15.52 ± 0.85 <sup>a</sup>	32.16 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.68 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>30 min</b>	11.40 ± 1.52 <sup>a</sup>	35.47 ± 0.81 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.04 <sup>b</sup>
<b>60 min</b>	14.23 ± 1.04 <sup>a</sup>	34.29 ± 0.10 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>120 min</b>	6.72 ± 0.28 <sup>b</sup>	36.03 ± 0.92 <sup>b</sup>	ND
<b>EFFND</b>			
<b>6 h</b>	2.17 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.18 <sup>f</sup>	0.22 ± 0.15 <sup>b</sup>
<b>12 h</b>	ND	ND	0.29 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>24 h</b>	ND	ND	ND

FCL: Frijol cocido liofilizado; EFFND: Extracto de la fermentación de la fracción no digerible. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la Prueba de Tukey. ND= No Detectado o por debajo del límite de detección. Los valores del intestino delgado a diferentes tiempos corresponden al lado apical. <sup>1</sup> Contenido de oligosacáridos en mg compuesto/g de muestra.

El contenido de oligosacáridos del FCL se encuentran valores de 6.27 mg/g para rafinosa, 39.79 mg/g de estaquiosa y 1.23 mg/g de verbascosa. Estos resultados son ligeramente mayores para rafinosa con valores entre 2.47 a 4.72 mg/g y similares para estaquiosa con valores de 35.30 a 48.49 mg/g, de acuerdo a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014) para la misma variedad de frijol.

Para otras variedades de frijol los valores reportados se encuentran por debajo de lo encontrado, Brummer *et al.* (2015) informan para frijol Navy (blanco) valores de

2.89, 21.68 y 0.97; para frijol Pinto se reportan valores de 3.4, 19.89 y 0.69 mg/g de rafinosa, estaquiosa y verbascosa respectivamente y para frijol Kidney, Fan *et al.* (2015) reportan valores para rafinosa de 4.1-6.1 mg/g, verbascosa de 0.6-0.9 mg/g, pero con un valor mayor de estaquiosa con 40.9-44.7 mg/g.

De manera general los valores encontrados en este estudio entran en los intervalos reportados para frijol común, teniendo como oligosacárido mayoritario a la estaquiosa, seguido de rafinosa y por último con un valor mucho menor de verbascosa, similar a lo reportado por Fan *et al.*, (2015) que de igual manera encontró estas proporciones tanto para frijol (Kidney bean) como para otras leguminosas (Soybean, Hyacinth bean). Las diferencias se pueden atribuir a los distintos factores ambientales a los que las plantas fueron expuestas (Hacisalihoglu *et al.*, 2009).

Estos oligosacáridos también fueron cuantificados durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, en etapas de boca, estómago e intestino delgado.

Se puede observar que los valores de rafinosa, estaquiosa y verbascosa prácticamente permanecen similares durante la digestión, con pequeñas diferencias, esto es debido a que estos oligosacáridos son resistentes a la digestión, porque el tracto gastrointestinal del humano no produce enzimas  $\alpha$ -galactosidasa para romper enlaces de estos oligosacáridos (De Fatima Viana *et al.*, 2005).

En la etapa de fermentación colónica es cuando el contenido de estos oligosacáridos comienza a disminuir, a las 6 horas de fermentación se encontraron valores de 2.17, 0.43 y 0.22 mg/g de rafinosa, estaquiosa y verbascosa respectivamente. A las 12 horas de fermentación rafinosa y estaquiosa ya no son detectados, mientras que para verbascosa esto ocurre hasta las 24 horas de fermentación, resultados que sugieren que estos oligosacáridos fueron sustrato de las bacterias colónicas para producir ácidos grasos de cadena corta.

6.8 Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero sobre el pH.

La medida de pH en fermentaciones es importante, ya que se ha sugerido que es un biomarcador indirecto de fermentación colónica (Farmer *et al.*, 2014).

En el cuadro 13 se presenta el efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del frijol sobre el pH del medio de incubación.

**Cuadro 13.** Efecto de la Fracción No Digerible (FND) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero sobre el pH de fermentación colónica *in vitro*.

Tiempo (h)	Control (-)	Muestra	Control (+)
0	7.45 ± 0.17 <sup>Aa</sup>	7.40 ± 0.19 <sup>Aa</sup>	7.46 ± 0.21 <sup>Aa</sup>
6	6.89 ± 0.09 <sup>Ab</sup>	6.72 ± 0.17 <sup>Ab</sup>	3.97 ± 0.69 <sup>Bb</sup>
12	7.11 ± 0.09 <sup>Aab</sup>	6.91 ± 0.17 <sup>Aab</sup>	3.55 ± 0.60 <sup>Bb</sup>
24	7.44 ± 0.32 <sup>Aa</sup>	7.11 ± 0.20 <sup>Aab</sup>	3.76 ± 0.52 <sup>Bb</sup>

Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. El control (+) corresponde a Rafinosa (100 mg). Control (-) corresponde a saliva proveniente de la digestión *in vitro*. Diferentes letras (mayúsculas) por renglón expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) por la Prueba de Tukey para el mismo tiempo de fermentación. Diferentes letras (minúsculas) por columna expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) por la Prueba de Tukey entre los diferentes tiempos de fermentación para el mismo tipo de muestra.

Se puede observar que el valor de pH en las muestras y en el control negativo tiende a disminuir en el tiempo de incubación de 6 horas y comienza a aumentar a las 12 horas. En el caso del control positivo (rafinosa) también se muestra este comportamiento, pero en diferentes horas de incubación, el pH disminuye hasta las 12 horas y comienza a aumentar a las 24 horas de incubación, aunque no se muestra diferencias significativas. Este aumento de pH después de las 6 horas se puede atribuir a la producción de amoníaco (Sayar *et al.*, 2007).

Este comportamiento donde el pH tiende a aumentar en las muestras estudiadas, a las 12 horas de fermentación, difiere a lo encontrado por Campos-Vega *et al.* (2009) para extractos de polisacáridos de frijol, ya que el pH de las muestras sigue

disminuyendo hasta las 24 horas de incubación, esto puede deberse a la diferencia en la muestra, ya que ellos fermentaron 100 mg de extracto de polisacárido de frijol, mientras que en este trabajo se utilizó 70 mg de la fracción no digerible del frijol común sometido a digestión gastrointestinal *in vitro*.

Comparando el pH de las diferentes muestras contra los diferentes tiempos de fermentación (minúsculas) se puede observar que existen diferencias significativas sólo en cuanto al pH del tiempo 0 y del 6 en la muestra, control negativo y en control positivo, aunque para el control positivo el pH de los tiempos 6, 12 y 24 no presentaron diferencia significativa.

Comparando el pH en el mismo tiempo de fermentación (mayúsculas) se observa que no existen diferencias significativas entre los pH de la muestra y el control negativo, pero si hay diferencia en el pH del control positivo a partir del tiempo 6 de fermentación.

Se ha tomado el valor de pH como parámetro de salud intestinal, donde estos valores podrían regular el crecimiento de microorganismos y la actividad de enzimas en el metabolismo (Chung *et al.*, 2007). La reducción de pH relacionada a la producción de AGCC es uno de los efectos a la salud atribuidos a éstos, ya que inhibe los microorganismos patógenos y aumenta la absorción de algunos nutrientes (Macfarlane y Macfarlane, 2012). Ilhan *et al.* (2017), mostraron que el pH era el componente de mayor influencia sobre la estructura y función de comunidades microbianas y de las interacciones metabólicas y microbianas entre las especies fermentativas sensibles al pH.

#### 6.9 Contenido de ácidos grasos de cadena corta en distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la Fracción No Digerible de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.

Los productos mayoritarios de la actividad fermentativa en el intestino son los AGCC, principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico (Cummings *et al.*,

1987). Se derivan de la fermentación microbiana de fibras dietéticas, aunque también proteínas y péptidos que escapan la digestión pueden ser metabolizadas en el colon (Macfarlane y Macfarlane, 2012).

Existe evidencia de los efectos benéficos de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) derivados del metabolismo de la microbiota intestinal sobre el metabolismo energético del huésped, mejorando el ambiente intestinal y a diversos tejidos (Kasubuchi *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que los AGCC alteran la quimiotaxis y la fagocitosis, cambian la función celular y tienen efectos antiinflamatorios y antitumorígenos (Tan *et al.*, 2014).

En el cuadro 14 se presenta el contenido de AGCC en distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la FND de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.

**Cuadro 14.** Contenido de ácidos grasos de cadena corta en distintos tiempos de fermentación colónica *in vitro* de la Fracción No Digerible de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.

	Ác. acético <sup>1</sup>	Ác. propiónico <sup>1</sup>	Ác. butírico <sup>1</sup>	AGCC Totales	Relaciones Molares de AGCC
<b>EFFND</b>					
<b>6 h</b>	0.27 ± 0.03 <sup>Bc</sup>	ND	ND	0.27	100:0:0
<b>12 h</b>	2.59 ± 0.76 <sup>Bb</sup>	10.91 ± 0.23 <sup>Ab</sup>	6.97 ± 3.44 <sup>A</sup>	20.47	13:53:34
<b>24 h</b>	10.02 ± 0.002 <sup>Ba</sup>	12.38 ± 0.003 <sup>Aa</sup>	ND	22.4	45:55:0
<b>RAFINOSA</b>					
<b>6 h</b>	42.25 ± 7.78 <sup>A</sup>	7.59 ± 1.62 <sup>B</sup>	5.40 ± 0.90 <sup>A</sup>	55.24	76:14:10
<b>12 h</b>	47.45 ± 9.67 <sup>A</sup>	6.73 ± 1.76 <sup>B</sup>	6.52 ± 3.99 <sup>A</sup>	60.7	80:13:7
<b>24 h</b>	62.05 ± 18.06 <sup>A</sup>	8.60 ± 1.44 <sup>B</sup>	5.75 ± 1.03 <sup>A</sup>	76.4	81:11:8

EFFND= Extracto fermentado de fracción no digerible de fracción no digerible de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero equivalente a 100 mg de extracto de polisacáridos. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. <sup>1</sup>Contenido de ácidos grasos de cadena corta expresados en mmol/100 mg. Diferentes letras (mayúsculas) por columna expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey. Diferentes letras (minúsculas) por columna en la fila de EFFND expresan diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por la prueba de Tukey.

La producción de ácido acético y propiónico para la muestra aumenta conforme al tiempo, teniendo su mayor producción a las 24 h de fermentación, resultados que coinciden con lo reportado por otros autores en diferentes estudios (Campos-Vega *et al.*, 2012a; Hernández-Salazar *et al.*, 2010).

La producción de ác. propiónico en la muestra (10.9-12.38 mmol/L) fue mayor que en la del control (6.73-8.6 mmol/L) con diferencias significativas.

Valores similares de ácido propiónico entre 9-11 mmol/L y 9-12 mmol/L para 12 y 24 h de fermentación, respectivamente, se reportan por Campos-Vega *et al.* (2009) para fermentación colónica de 100 mg de extracto de polisacáridos de diversas variedades de frijol, de igual manera, con valores mayores a lo producido por el control de rafinosa con 6-8 mmol/L.

Se han reportado producciones más bajas de ácido propiónico a las 12 y 24 h de fermentación colónica, con valores que van de 2-4 mmol/mL (Campos-Vega *et al.*, 2012a) y de 5.3-5.6 mmol/mL (Hernández-Salazar *et al.*, 2010) para frijol común de diferentes variedades e incluso para fermentación de otra matriz alimentaria como café usado con valores de 7.5-10.6 mmol/L (López-Barrera *et al.*, 2016).

La producción de ácido butírico en la muestra sólo se detecta a las 12 h de fermentación (6.97 mmol/L), sin diferencias significativas contra el control (5.40-6.52 mmol/L).

Para la producción de ácido butírico reportados en la literatura, los valores van desde debajo de lo encontrado con 2.5 mmol/mL a las 12 horas de fermentación (Hernández-Salazar *et al.*, 2010), o con valores similares de 6.7-7.3 mmol/L (López-Barrera *et al.*, 2016), aunque ya para las 24 horas de fermentación se han reportado valores más altos de 13-15 mmol/L para frijol (Campos-Vega *et al.*, 2009) y de 7.8-7.9 mmol/L para café usado (Hernández-Salazar *et al.*, 2010).

Valores similares se obtuvieron de la fermentación de 24 h de almidón resistente con diferentes tratamientos y después de ser sometido a digestión de un almidón de maíz alto en amilosa, donde reportan valores de ác. propiónico menores a los encontrados con 2.8-9.4 mmol/L y valores de ác. butírico dentro de lo encontrado con 2.2-14.55 mmol/L (Zhou *et al.*, 2013).

La fermentación de la FND de frijol, comparada contra el control, aumenta las proporciones molares de ácido propiónico a las 12 y 24 h de fermentación y las de ácido butírico a las 12 h.

#### 6.10 Contenido de proteína en fracción no digerible y fermentación colónica *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

Se cuantificó la cantidad de proteína presente en la FND en su último tiempo de incubación (12 min), así como los extractos de fermentación en los diferentes tiempos de ésta.

Las bacterias en el intestino humano pueden sintetizar aminoácidos y producir gran variedad de metabolitos por fermentación de proteínas, algunos con efectos benéficos, como AGCC y otros ácidos orgánicos; así como perjudiciales, tales como sulfuro y amoníaco (Davila *et al.*, 2013; Portune *et al.*, 2016).

En el cuadro 15 se presenta el contenido de proteína en fracción no digerible y fermentación colónica *in vitro* de la FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

**Cuadro 15.** Contenido de proteína en fracción no digerible y extracto de la fermentación colónica *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero.

<b>Concentración de proteínas totales (mg/g muestra)</b>	
<b>FRACCIÓN NO DIGERIBLE</b>	
<b>120 min</b>	19.15 ± 3.91 <sup>a</sup>
<b>EFFND</b>	
<b>6 h</b>	6.02 ± 2.38 <sup>b</sup>
<b>12 h</b>	4.49 ± 1.16 <sup>b</sup>
<b>24 h</b>	17.62 ± 3.43 <sup>a</sup>

Datos expresados como la media desviación estándar de experimentos independientes. Datos expresados en mg/g de muestra. Diferentes letras expresan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). EFFND= Extracto Fermentado de la Fracción No Digerible.

La cantidad de proteína en la fracción no digerible fue de 19.15 mg/g, se puede observar que a las 6 horas de fermentación esta cantidad disminuye a 6.02 mg/g y a las 12 horas se tiene un valor menor de 4.49 mg/g aunque sin diferencia significativa con el tiempo 6 h. Al transcurrir las 24 horas de fermentación la cantidad de proteína aumenta, llegando a 17.62 mg/g, sin diferencia significativa con el de la fracción no digerible.

La disminución en las concentraciones de proteínas de puede deber a que los microorganismos presentes en el colon utilizan estos aminoácidos para producir

diferentes metabolitos entre los que se encuentran ácidos grasos de cadena ramificada, como isobutirato, isovalerato y 2-metilbutirato (Smith y Macfarlane, 1997) y a la producción de NH<sub>3</sub> a través de la desaminación de aminoácidos (Blachier *et al.*, 2007).

El aumento posterior de la cantidad de proteína pudiera deberse a la nueva producción de aminoácidos por la microbiota, los efectos de ésta producción en el cuerpo y la salud humana no son comprendidos del todo. Los aminoácidos producidos que pudieran ser accesibles al huésped podrían ser útiles en deficiencias de aminoácidos esenciales (Portune *et al.*, 2016). Sin embargo, éstos también podrían tener consecuencias perjudiciales como la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 donde las concentraciones sistémicas de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada son elevadas (Neis *et al.*, 2015).

La utilización del sustrato por la microbiota es determinada por la cantidad de carbohidratos y proteína disponibles (Smith y Macfarlane, 1996). En ese sentido, el consumo de fibra puede reducir la fermentación de proteínas (De Preter *et al.*, 2011) ya que la disponibilidad de carbohidratos complejos puede reducir la fermentación de éstas (Birkett *et al.*, 1996; Geboes *et al.*, 2006).

#### 6.11 Efecto del extracto fermentado de la fracción no digerible en macrófagos murino.

En los ensayos celulares, se evaluó la viabilidad celular para conocer la citotoxicidad del extracto de fermentación de 12 horas a diferentes concentraciones sobre el modelo de macrófagos murino RAW 264.7, de esta manera, se evaluaron posteriormente las mismas concentraciones en la reducción de la producción de óxido nítrico para conocer su potencial antiinflamatorio. Se eligió el extracto de fermentación de 12 horas porque presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos y mayor cantidad de ácido propiónico.

### 6.11.1 Efecto del extracto de fermentación de la fracción no digerible de frijol común sobre la viabilidad celular.

Se evaluó la viabilidad de las células RAW 264.7 por medio del ensayo de MTT para conocer la citotoxicidad de las diferentes concentraciones del extracto de fermentación de 12 horas, de la fracción no digerible de frijol común. En la figura 5 se muestra las diferentes concentraciones de dicho extracto y el porcentaje de viabilidad.

#### TRATAMIENTO % DE VIABILIDAD

TRATAMIENTO	% DE VIABILIDAD
CTRL (-)	100
EF 5 %	107.06 ± 12.12
EF 10 %	100.54 ± 3.72
EF 15 %	100.05 ± 5.23
EF 20 %	106.03 ± 4.74
EF 25 %	99.94 ± 7.87
EF 30 %	80.70 ± 1.03*
EF 40 %	51.80 ± 4.06*
EF 50 %	46.90 ± 3.23*

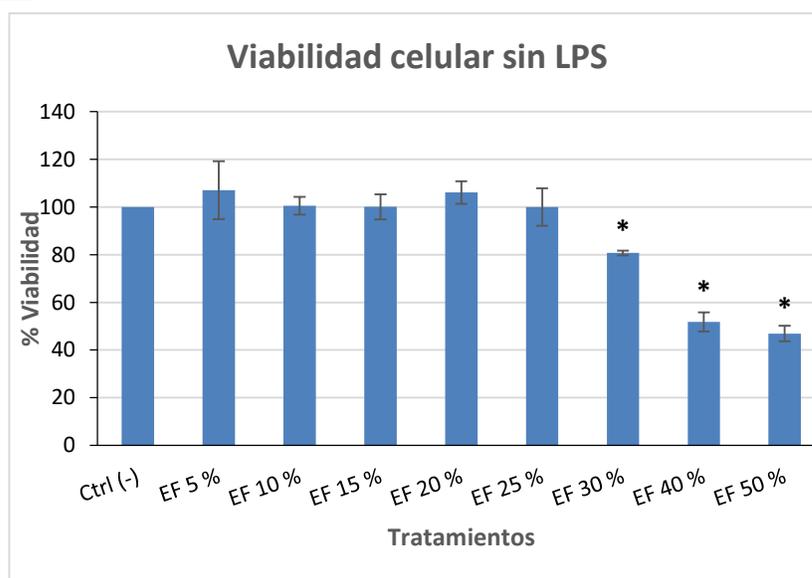


Figura 5. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la viabilidad celular en macrófagos murino RAW 264.7 sin lipopolisacáridos. Ctrl (-) = Células con medio sin EF ni LPS. EF= Extracto fermentado de la fracción no digerible. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. \* Expresan diferencias significativas respecto al Ctrl (-) por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Se puede observar en la figura 5 que los extractos diluidos al 30, 40 y 50 % presentaron diferencias estadísticas contra el control negativo que fueron las células sin extracto de fermentación y sin LPS, aunque los tratamientos del 5 al 30 % mostraron viabilidades mayores al 80 % por lo que estos son los tratamientos que podrían ser utilizados para determinar la producción de óxido nítrico sin presentar

citotoxicidad en las células RAW 264.7; los extractos al 40 y 50 % mostraron un porcentaje de viabilidad menor al 80 %, presentando citotoxicidad en las células, por lo que no fueron utilizados para posteriores determinaciones.

Estos resultados de viabilidad son comparables con los extractos de fermentación de una botana horneada de maíz y frijol sometida igualmente a una digestión gastrointestinal *in vitro* y su posterior fermentación, cuyos extractos de fermentación al 40 y 50 % también mostraron porcentajes de viabilidad menores al 80 % en células RAW 264.7 (Luzardo-Ocampo, 2016). Estos ensayos de viabilidad dependerán del extracto utilizado, ya que se tiene una composición distinta, por ejemplo, para un extracto de fermentación de la fracción no digerible de café usado, no se presentó citotoxicidad en extractos del 5 al 25 % para la misma línea celular sin LPS (López-Barrera *et al.*, 2016)

De igual manera, se evaluó la viabilidad de las células RAW 264.7 estimuladas con LPS, por medio del ensayo de MTT para conocer la citotoxicidad de las mismas concentraciones del extracto de fermentación de 12 horas, de la FND de frijol común. En la figura 6 se muestra las diferentes concentraciones de dicho extracto y el porcentaje de viabilidad en células estimuladas con LPS.

**TRATAMIENTO % DE VIABILIDAD**

TRATAMIENTO	% DE VIABILIDAD
LPS (+)	100
EF 5 %	95.81 ± 4.07
EF 10 %	105.05 ± 4.86
EF 15 %	106.92 ± 4.91
EF 20 %	103.23 ± 4.74
EF 25 %	104.82 ± 4.81
EF 30 %	119.73 ± 5.51*
EF 35 %	93.24 ± 4.30

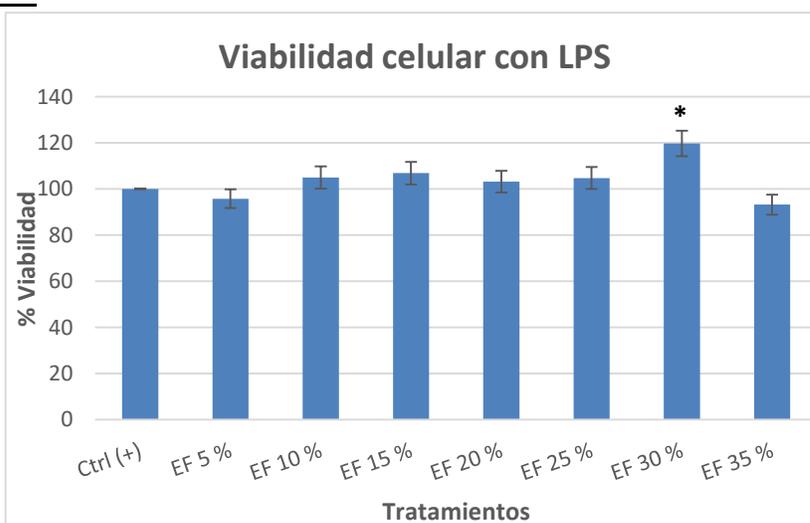


Figura 6. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la viabilidad celular en macrófagos murino RAW 264.7 con lipopolisacáridos. LPS (+) = Células con LPS sin EF. EF= Extracto fermentado de la fracción no digerible. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. Diferentes letras expresan diferencias significativas respecto al Ctrl (+) por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Se observa que ninguno de los tratamientos del 5 % al 35 % presentaron citotoxicidad en estas células estimuladas con LPS, al no presentar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control positivo (células estimuladas con LPS).

Estos valores son similares a lo reportado por Islas-Gómez (2015), para extractos de fermentación de frijol, después de ser sometido a digestión gastrointestinal *in vitro*, donde en tratamientos que van del 10-50 % encuentra viabilidades de 90.7-113.67 % en macrófagos RAW 264.7; y de igual forma son similares a lo reportado por López-Barrera *et al.*, (2016), pero para extractos fermentados de café usado, con tratamientos diluidos del 5-25 % donde presentaban viabilidades de entre el 87 % y 91.9 %.

Los tratamientos estudiados, al no presentar viabilidades menores del 80 % en las células, fueron los utilizados para determinaciones posteriores, como la producción de óxido nítrico (ON).

### 6.11.2 Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con LPS.

Diversos complejos químicos y citológicos están involucrados en la inflamación, estos ocurren en respuesta a lesiones causadas por factores biológicos, físicos o químicos. En condiciones fisiológicas normales, la inflamación es una respuesta homeostática normal, sin embargo, cuando la inflamación persiste de forma crónica se puede volver una respuesta dañina (Ross, 1999). La reducción de la respuesta inflamatoria podría ser un objetivo terapéutico para diversas enfermedades (Tsao *et al.*, 2002; Lind *et al.*, 2017).

El óxido nítrico es un radical libre, algunas de sus funciones son: la destrucción de microorganismos, la vasodilatación y la lisis de células de tumor, pero una producción irregular tiene como consecuencia: inducción de daño al DNA, estimulación de la angiogénesis, y mantenimiento del proceso inflamatorio que causa daño al tejido y se ha asociado como parte de la patogénesis de: artritis reumatoide, diabetes y carcinogénesis (Pérez-Ruiz *et al.*, 1997; Gordon, 2003, Fujiwara y Kobayashi, 2005).

La Figura 7 muestra la producción de ON según las diferentes diluciones de los tratamientos de EF de la FND del frijol común cocido en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con LPS.

**TRATAMIENTO % PRODUCCIÓN ON**

LPS (-)	12.46 ± 1.52*
LPS (+)	100
EF 5 %	74.21 ± 1.50*
EF 10 %	75.76 ± 2.15*
EF 15 %	64.42 ± 2.47*
EF 20 %	54.46 ± 0.07*
EF 25 %	44.40 ± 0.21*
EF 30 %	39.59 ± 2.40*
EF 35 %	39.78 ± 0.74*

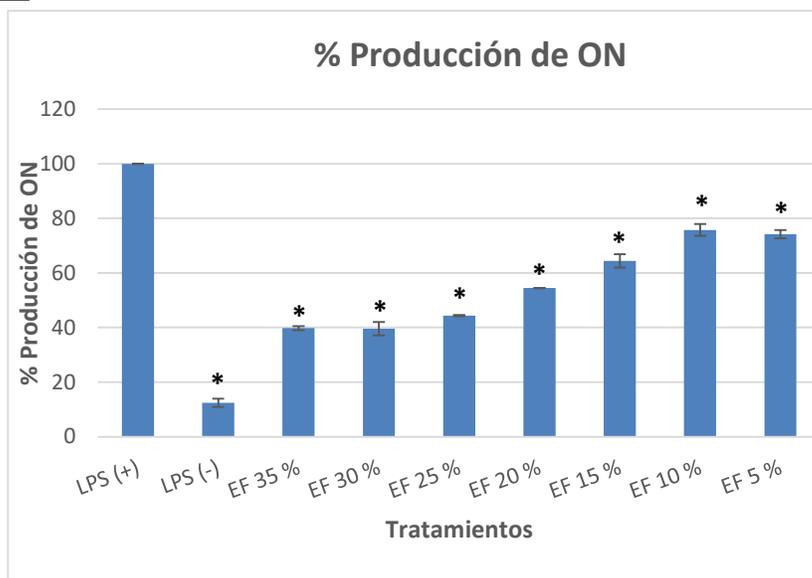


Figura 7. Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos murino RAW 264.7 con lipopolisacáridos. EF= Extracto fermentado de la fracción no digerible. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes. \* Expresan diferencias significativas respecto al LPS (+) por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Se observa que la producción de ON disminuyó de manera dosis-dependiente a la concentración del tratamiento, siendo el EF 35% el que mostró una menor producción, esto comparado contra la producción de ON del control positivo LPS (+). Cabe destacar que todos los tratamientos desde el 5 al 35 % presentan diferencias significativas en la producción de ON con respecto al control LPS (+).

De igual manera, un EF de la FND de café usado demostró tener efecto sobre la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, aunque con un menor efecto, ya que la reducción del 50 % de la producción de ON se encontró en un extracto más concentrado (EF al 50 %) (López-Barrera *et al.*, 2016). Estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferentes matrices alimentarias utilizadas.

Para conocer cuál es el porcentaje del EF de la FND de frijol necesario para inhibir hasta el 50 % de la producción de óxido nítrico, se llevó a cabo el cálculo de la concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) del ON mediante fórmulas que se adaptaran

al comportamiento del fenómeno, se utilizaron ecuaciones de 3er orden que se muestran en la Figura 8.

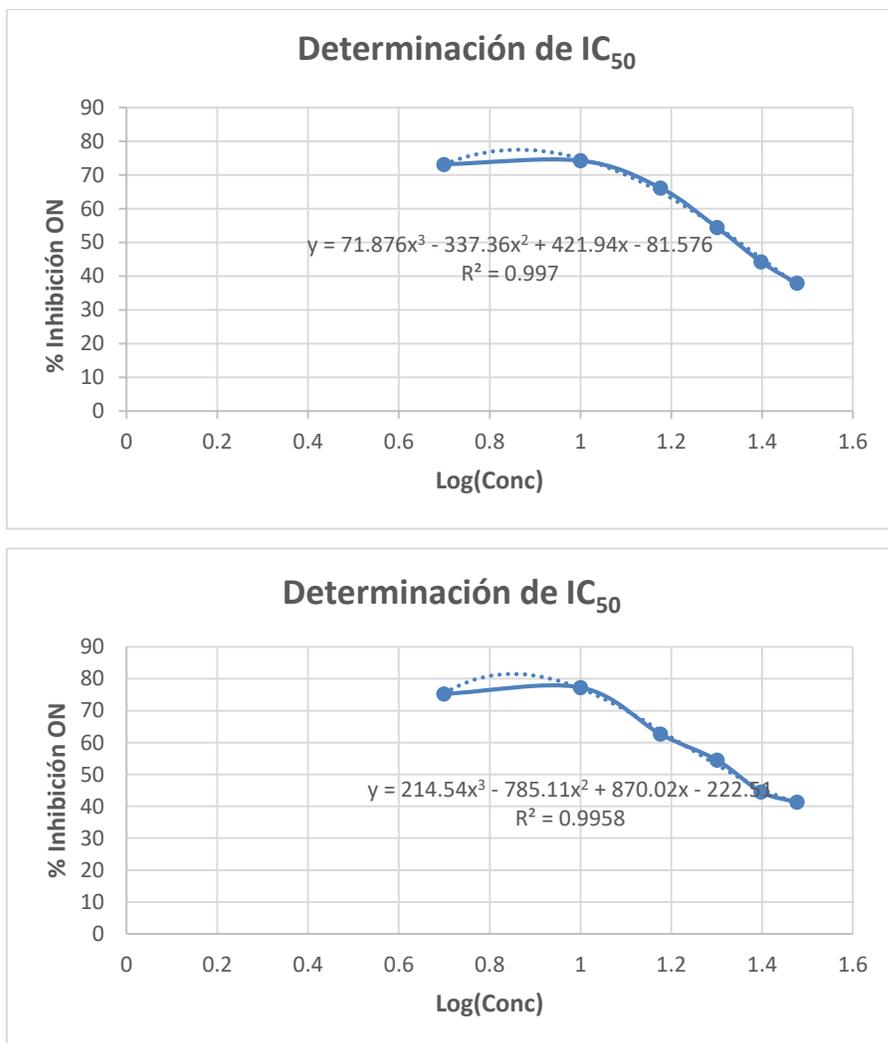


Figura 8. Concentración media inhibitoria de ON para EF 12 h en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. IC<sub>50</sub>: concentración media inhibitoria; ON: óxido nítrico. Datos expresados como la media ± desviación estándar de experimentos independientes.

La IC<sub>50</sub> del ON para el EF de 12 h fue del 22.07%. Éste extracto fue el utilizado para determinar proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio en células RAW 264.7 estimulados con LPS.

Este valor concuerda a lo reportado por Islas-Gómez (2015) para un EF de FND de frijol cocido, donde la IC<sub>50</sub> se encontró en el EF 21.96 %, donde posteriormente

evaluaron los compuestos fenólicos encontrados en éste extracto, mostrando una mayor inhibición de la producción de ON del 59.90 %, concluyendo que el EF 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 antagonico en la inhibición de la producción de ON.

López-Barrera *et al.* (2016) evaluaron los AGCC encontrados en la IC<sub>50</sub> del EF de la FND de café usado, encontrando una inhibición del 72.6 % en la producción de ON de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Se sabe que la isoforma iNOS, enzima encargada de la producción de ON, es inducida por citocinas inflamatorias, a través de la vía NF- $\kappa$ B (Lind *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la expresión de iNOS se incrementa en el tejido de colitis humana, sugiriendo su contribución a la enfermedad inflamatoria y, por lo tanto, un posible tratamiento terapéutico es su inhibición (Gochman *et al.*, 2012).

Se estudió el silenciamiento del gen de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) teniendo como resultado la inhibición de la inflamación local a través de la disminución de la expresión de iNOS (Zhao *et al.*, 2014).

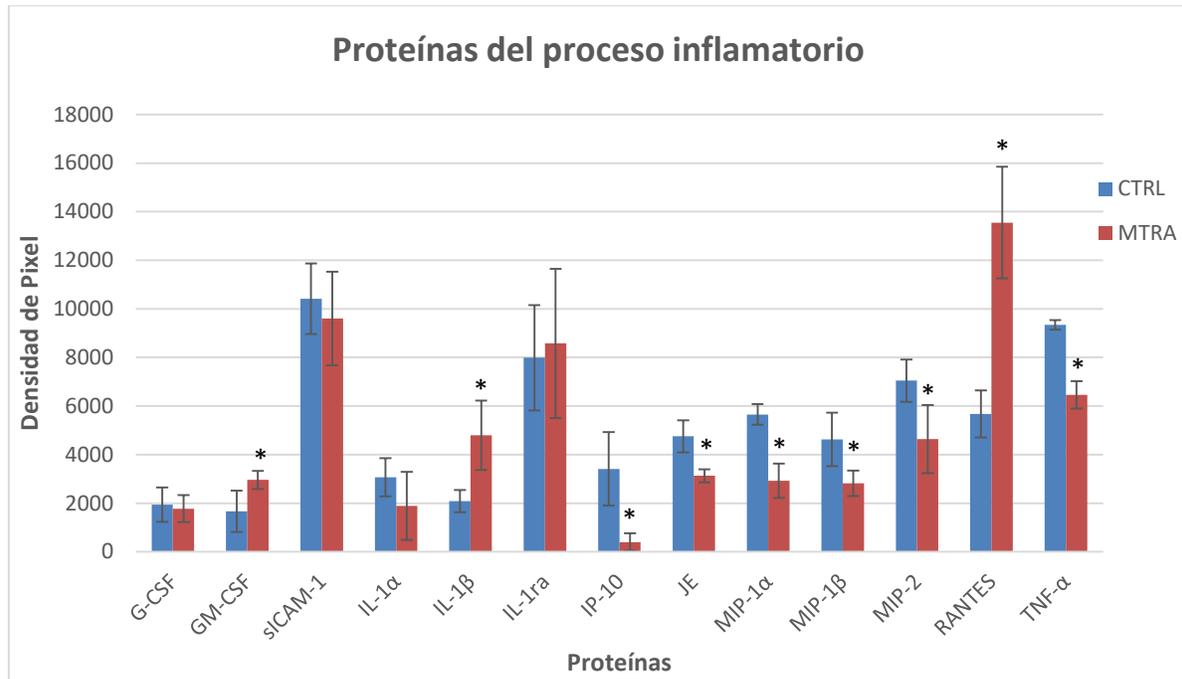
Por lo que es de importancia dilucidar las proteínas de inflamación involucradas en este potencial efecto antiinflamatorio del EF de la FND de frijol común cocido al inhibir la producción de ON.

#### 6.11.3 Efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de citocinas en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con LPS.

Se evaluó la regulación y expresión de citocinas y quimiocinas de células RAW 264.7 inducidas con LPS y cultivadas con la IC<sub>50</sub> del EF de 12 h de frijol común cocido, para conocer mecanismos de modulación de la inflamación. De las 40

citocinas estudiadas, 9 mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) contra el control, de las cuales 3 aumentaron su expresión y 6 disminuyeron.

En la figura 9 se muestra el efecto del EF de frijol común cocido sobre la producción de proteínas de inflamación.



**Figura 9.** Efecto del EF de la fracción no digerible de frijol común cocido sobre la producción de proteínas de inflamación en macrófagos murino RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos. Datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de experimentos independientes. \* Expresan diferencias significativas de la Muestra (MTRA) respecto al Control (CTRL) por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Dentro de las proteínas que aumentaron su expresión encontramos a GM-CSF (CSF2), IL-1 $\beta$  y RANTES (CCL5).

GM-CSF (CSF2) es una citocina que estimula la producción, proliferación, diferenciación y supervivencia de células precursoras hematopoyéticas de varias líneas celulares incluyendo granulocitos, macrófagos, eosinófilos y eritrocitos (Hamilton, 2008; Becher *et al.*, 2016).

IL-1 $\beta$  es una potente citocina proinflamatoria, importante mediador de la respuesta inmune temprana (Dalmás *et al.*, 2014).

RANTES (CCL5) es una proteína quimioatrayente de monocitos, eosinófilos y células T de memoria y colaboradoras. Produce liberación de histamina de basófilos y activa a eosinófilos. Pertenece a la familia de quimioquinas CC cuyos miembros incluyen proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) -1, MCP-2, MCP -3, I-309, proteína inhibidora de macrófagos-1 $\alpha$  y proteína inhibidora de macrófagos-1 $\beta$ . (Schall *et al.*, 1988; Lv *et al.*, 2013).

El análisis de éstas 3 proteínas por STRING las coloca dentro de los procesos biológicos relacionado con la respuesta celular a LPS y a la regulación positiva de producción de citocinas. Éstas células fueron estimuladas con una concentración de LPS de 1  $\mu$ g/mL, y se ha demostrado que, con esta concentración, no disminuye la expresión de ciertas citocinas pro-inflamatorias, a pesar de ser tratadas con extractos que demostraron disminuir el efecto inflamatorio. García-LaFuente *et al.* (2014) para un extracto rico en polifenoles de 2 tipos de frijol común, para macrófagos estimulados con esta misma dosis, no encontraron disminución en la expresión de la interleucina 6 (IL-6), interleucina 1-  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) ni de TNF- $\alpha$ , sin embargo, si se observa disminución significativa en células estimuladas con 10 y 100 ng/mL de LPS. De igual manera, se observó que un extracto en polifenoles de hongos comestibles, en macrófagos estimulados con 1  $\mu$ g/mL disminuyó la expresión de IL-1  $\beta$ , e IL-6, pero no mostró disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  (Moro *et al.*, 2012).

Sin embargo, a pesar de utilizar esta misma dosis de LPS (1  $\mu$ g/mL), el EF de la FND de frijol común demostró disminuir la expresión de proteínas como IP-10, JE, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 incluyendo TNF- $\alpha$ .

IP-10 (CXCL10) es una citocina proinflamatoria, puede participar en la función de células T efectoras y posiblemente en el desarrollo de células T. Fue inicialmente identificado como una quimioquina secretada por varias células tipos que incluyen macrófagos, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Lee *et al.*, 2009). CXCL10 se une a su receptor CXCR3 y regula el sistema inmune respuestas a través del reclutamiento de leucocitos, incluidas las células T y los monocitos / macrófagos (Lee *et al.*, 2009).

JE (CCL2) “MCP-1” es una quimiocina inflamatoria producida por células monocíticas con actividad quimiotáctica específica para monocitos innatos de células inmunes y basófilos (Deshmane *et al.*, 2009).

MIP-1 $\alpha$  (CCL3) es una proteína con propiedades inflamatorias, pirogénicas y quimiocinéticas. Tiene una potente actividad quimiotáctica hacia eosinófilos. Es un miembro de la familia de quimioquinas CC (Davatelis *et al.*, 1988). La CCL3 y quimiocinas CC relacionadas como CCL4 y CCL5 se clasifican como quimiocinas inflamatorias debido a su capacidad para inducir la movilización quimiotáctica de células de linaje de monocitos y linfocitos en tejidos inflamatorios. CCL3 también regula la proliferación de células madre / progenitoras hematopoyéticas (HSPC) en la médula ósea (BM) (Cook, 1996; Baba y Mukaida, 2014).

MIP-1 $\beta$  (CCL4) es una proteína con propiedades inflamatorias y quimiocinéticas. Se utiliza como inductor de lesión hepática aguda (Murthy *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

MIP-2 (CXCL2) es una proteína quimiotáctica para leucocitos polimorfonucleares humanos, pero no induce quimiocinesis o una explosión oxidativa. La proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) -2 es una de las quimiocinas CXC y también se conoce como ligando CXC de quimioquinas (CXCL2). El MIP-2 afecta el reclutamiento y la activación de los neutrófilos a través de la vía de señalización dependiente de mitógeno-proteína-quinasa activada, uniéndose a sus receptores específicos, CXCR1 y CXCR2. MIP-2 es producida por una variedad de tipos de células, como macrófagos, monocitos, células epiteliales y hepatocitos, en respuesta a infección o lesión (Qin *et al.*, 2017).

TNF- $\alpha$  es una citocina producida por células inflamatorias como monocitos, macrófagos y neutrófilos, podría estimular la secreción de citoquinas y aumentar la respuesta inflamatoria. Es un potente pirógeno que causa fiebre por acción directa o por estimulación de la secreción de interleucina-1 y está implicado en la inducción de caquexia. En ciertas condiciones, puede estimular la proliferación celular e inducir la diferenciación celular (Sargi *et al.*, 2012).

El análisis de éstas 6 proteínas por STRING las relaciona con la migración de leucocitos y la regulación positiva a la respuesta por estímulos externos y cuatro de estas proteínas participan en la vía de señalización de TNF.

Se ha encontrado que TNF- $\alpha$ , producido por tumores asociados a macrófagos (TAM), también promueve la invasión de células de cáncer de ovario (Hagemann *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 1989). Los TAM han demostrado representar un papel importante en la red de citocinas del cáncer de ovario para el mantenimiento de la adhesión e invasión de las células de cáncer de ovario (Kulbe *et al.*, 2012). Los TAM secretan múltiples citocinas promotoras de metástasis que incluyen IL-6, IL-10, CCL18, CCL22, TNF- $\alpha$  y TGF $\beta$  (Rodríguez *et al.*, 2001). Se ha observado que el número de TAM está regulado positivamente por CCL2/MCP-1, que se libera de las células de cáncer de ovario en la ascitis (Negus *et al.*, 1995). De igual manera, se ha correlacionado la presión sanguínea elevada con la expresión de los receptores de quimiocinas CCR2 de los macrófagos en el tejido adiposo visceral perivascular y sus ligandos como CCL2, CCL7, CCL8 y CCL12 (Chan *et al.*, 2012).

Macrófagos infiltrados en artritis reumatoide, son activados y expresan niveles elevados de TNF, IL-1 $\beta$  pero también IL-10, también secretan quimiocinas como CCL2 y RANTES, así como IL-6, IL-8, MMP-3 (Kontny y Prochorec-Sobieszek, 2013).

CCL2 mantiene la activación clásica de los macrófagos, posiblemente mediando una aumentada expresión génica proinflamatoria (Carson *et al.*, 2017).

Existe evidencia que respalda una participación de CCL3 en la fisiopatología de varios tipos de leucemia derivados de la transformación neoplásica de la proliferación de células madre / progenitoras hematopoyéticas (Baba y Mukaida, 2014).

Se ha encontrado un papel importante de CCL4 en tumorigénesis, Fang *et al.* (2013) identificaron los ejes receptores de andrógeno-CCL4-STAT3A como reguladores clave durante la iniciación del tumor prostático y resaltan los roles importantes de infiltrar macrófagos y citocinas inflamatorias para la tumorigénesis de próstata.

Se ha identificado el receptor acoplado a la proteína G CXCR2 (reconociendo quimioquinas CXCL1 y CXCL2) inductor de la activación regulada de NLRP3 (Dominio de pirina de la familia NLR que contiene 3) en inflamomas en macrófagos. El bloqueo *in vivo* de CXCL1 y CXCL2 puede reducir significativamente el Mycobacterium tuberculosis- inducida por la producción de IL-1b bioactivo (Boro y Balaji, 2017).

En la lesión hepática, las células Kupffer activadas se conocen como la principal fuente de MIP-2. Los neutrófilos reclutados y activados por MIP-2 pueden acelerar la inflamación del hígado al liberar varios mediadores inflamatorios (Qin *et al.*, 2017).

Se ha reportado que CXCL10 tiene un papel importante en la inflamación de las articulaciones y la destrucción ósea en la artritis (Lee *et al.*, 2017).

Las enfermedades no transmisibles se han asociado a disfunciones homeostáticas de diversos tejidos como el adiposo, caracterizado por una inflamación crónica de bajo grado, observándose en obesidad, resistencia a la insulina y a la diabetes. Se ha identificado mediante el aumento de citocinas o quimiocinas como MCP-1, RANTES, IL-6, interferón (IFN) gamma o TNF $\alpha$ . La infiltración de células inmunes se ha asociado al tejido adiposo disfuncional, entre los que se encuentran macrófagos, células efectoras y de memoria T, células Natural Killer y granulocitos (Guzik *et al.*, 2017).

Diversos estudios han concluido que la terapia anti-TNF mejora la sensibilidad a la insulina o hiperglucemia y reducción el riesgo de diabetes (Burska *et al.*, 2015; Solomon *et al.*, 2011).

El fomento de la ingesta de más factores dietéticos antiinflamatorios, como los alimentos a base de plantas ricos en fibra y fitoquímicos, y la reducción de la ingesta de factores proinflamatorios, como los alimentos fritos o procesados ricos en ácidos grasos trans, podrían ser una estrategia potencial para reducir el riesgo de colitis ulcerosa entre otras enfermedades relacionadas con la inflamación (Shivappa *et al.*, 2016).

Diversos metabolitos de la fermentación colónica, por ejemplo de CF, han demostrado tener efecto antiinflamatorio, Monagas *et al.* (2009) reportaron que los ácidos como el ácido 3,4-dihidrofénilacético y 3,4-dihidrofénilpropiónico, tuvieron propiedades antiinflamatorias al disminuir TNF-, IL- e IL-6 en células mononucleares estimuladas con LPS.

También se ha estudiado el rol de prebióticos, en especial de oligosacáridos, y de AGCC y su efecto anti-inflamatorio, donde existe evidencia que respalda los beneficios antiinflamatorios (McLoughlin *et al.*, 2017).

## 7. CONCLUSIONES

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido presentó una importante cantidad de proteína (18.87%), fibra como fibra insoluble (56.62 %) y almidón resistente (24.57 %). Durante la digestión gastrointestinal del frijol común, existieron interacciones que alteraron la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y oligosacáridos, viéndose aumentada o disminuida su cantidad en las diferentes etapas de la digestión.

Entre los compuestos fenólicos con mayor bioaccesibilidad encontramos a ácidos como gálico, clorogénico y caféico y también flavonoides como (+)-catequina. De éstos, los mayormente biodisponibles fueron los ácidos fenólicos, que, a pesar de su absorción, también hubo mayor liberación de la matriz alimentaria y consecuente formación por las bacterias presentes en el colon. Entre los oligosacáridos, se identificaron: estaquiosa y rafinosa, que, a pesar de ser liberados, éstos no son absorbidos y se encontraron en la FND, cuya fermentación aumentó la cantidad de AGCC. Estos componentes liberados y/o biotransformados por la microbiota intestinal, que se encontraron en el extracto fermentado, le confirieron una gran capacidad antioxidante.

El extracto de fermentación (EF) de la fracción no digerible (FND) de frijol común mostró un fuerte efecto anti-inflamatorio al reducir la producción de ON, y al inhibir mediadores inflamatorios como IP-10, JE, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 y TNF- $\alpha$  en macrófagos RAW 264.7. Este efecto podría estar atribuido a la liberación de compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria y a la producción de metabolitos de estos, así como a la producción de AGCC producidos por la fermentación de fibra y oligosacáridos por la microbiota intestinal.

Este efecto sobre los macrófagos RAW 264.7 por el EF de la FND de frijol común puede reflejar una importante clave en la protección en el comienzo o progresión de enfermedades como colitis ulcerosa, diferentes tipos de cáncer, así como diabetes entre otras enfermedades inflamatorias crónicas.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, 593–623.
- Aguilera, Y., Estrella, I., Benítez, V., Esteban, R. M. & Martín-Cabrejas, M. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44, 774-780.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(Pt 3), 593–615.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551–562.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2002). Official Methods of Analysis. 19<sup>th</sup> Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA. Arlington, VA. Métodos: 920.39, 920.85, 920.105, 923.03 925.10, 925.23, 954.01, 991.43
- Aparicio-Fernández, X., García-Gasca, T., Yousef, G. G., Lila, M. A., González de Mejía, E., & Loarca-Pina, G. (2006). Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2116–2122.
- Aparicio-Fernández, X., Manzo-Bonilla, L., & Loarca-Piña, G. F. (2005a). Comparison of Antimutagenic Activity of Phenolic Compounds in Newly Harvested and Stored Common Beans *Phaseolus vulgaris* against Aflatoxin B1. *Journal of Food Science*, 70(1), S73–S78.
- Aparicio-Fernández, X., Reynoso-Camacho, R., Castaño-Tostado, E., García-Gasca, T., González de Mejía, E., Guzmán-Maldonado, S. H., Elizondo, G., Yousef, G.G., Lila, M.A., Loarca-Pina, G. (2008). Antiradical capacity and induction of

apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 63(1), 35–40.

Aparicio-Fernandez, X., Yousef, G. G., Loarca-Pina, G., de Mejia, E., & Lila, M. A. (2005b). Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4615–4622.

Arends, M. J., White, E. S., & Whitelaw, C. B. A. (2016). Animal and cellular models of human disease. *The Journal of pathology*, 238(2), 137-140.

Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1), 27-43.

Aura, A. M., O'leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., ... & Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1725-1730.

Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z., & Schwartz, B. (2002). Different Molecular Events Account for Butyrate-Induced Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines. *The Journal of Nutrition*, 132(7), 1812–1818.

Baba, T., & Mukaida, N. (2014). Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ /CCL3 in leukemogenesis. *Molecular & cellular oncology*, 1(1), e29899.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Drug metabolism and Disposition*, 34(3), 457-463.

Baptista, A., Pinho, O., Pinto, E., Casal, S., Mota, C., & Ferreira, I. M. (2016). Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2(11), 442-450.

Barampama, Z., & Simard, R. E. (1993). Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chemistry*, 47(2), 159-167.

Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C., Vupputuri, S., Myers, L., & Whelton, P. K. (2001). Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Archives of Internal Medicine*, 161(21), 2573-2578.

Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M. G. C., & Aura, A.-M. (2008). Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 47(8), 442–452.

Becher, B., Tugues, S., & Greter, M. (2016). GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 45(5), 963-973.

Beninger, C. W., & Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7879–7883.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food chemistry*, 102(3), 865-874.

Beyer-Sehlmeyer, G., Gleib, M., Hartmann, E., Hughes, R., Persin, C., Böhm, V., Rowland, I., Jahreis, G., Pool-Zobel, B. L. (2003). Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *The British Journal of Nutrition*, 90(6), 1057–1070.

Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., & O'Dea, K. (1996). Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 766-772.

Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., & Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids*, 33(4), 547-562.

Boateng, J. A., Verghese, M., Walker, L. T., Shackelford, L. A., & Chawan, C. B. (2007). Inhibitory effects of selected dry beans (*Phaseolus* spp L) on azoxymethane-induced formation of aberrant crypt foci in Fisher 344 male rats. *Nutrition Research*, 27(10), 640–646.

Bode, L. M., Bunzel, D., Huch, M., Cho, G. S., Ruhland, D., Bunzel, M., ... & Kulling, S. E. (2013). *In vivo* and *in vitro* metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American journal of clinical nutrition*, 97(2), 295-309

Boro, M., & Balaji, K. N. (2017). CXCL1 and CXCL2 Regulate NLRP3 Inflammasome Activation via G-Protein–Coupled Receptor CXCR2. *The Journal of Immunology*, 199(5), 1660-1671.

Bredt, D. S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6), 577–596.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.

Brummer, Y., Kaviani, M., & Tosh, S. M. (2015). Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International*, *67*, 117-125.

Burska, A. N., Sakthiswary, R., & Sattar, N. (2015). Effects of tumour necrosis factor antagonists on insulin sensitivity/resistance in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, *10*(6), e0128889.

Campos-Vega, R., García-Gasca, T., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2012a). 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(51), 12443-12450.

Campos-Vega, R., Guevara-Gonzalez, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2010). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, *43*(4), 1057–1064.

Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, Oomah, B.D., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, *74*(7), T59–65.

Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, *77*, Part 2, 156–161.

Campos-Vega, R., Vergara-Castañeda, H. A., & Oomah, B. D. (2012b). Functional food sources: Beans in sight. *Beans: Nutrition, Consumption and Health*, 3–58.

Carbonaro, M., Grant, G., Cappelloni, M., & Pusztai, A. (2000). Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 742–749.

Cardador-Martínez, A., Albores, A., Bah, M., Calderón-Salinas, V., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R., Shimada-Miyasaka, A., Loarca-Piña, G. (2006). Relationship Among Antimutagenic, Antioxidant and Enzymatic Activities of Methanolic Extract from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(4), 161–168.

Cardador-Martínez, A., Castaño-Tostado, E., & Loarca-Piña, G. (2002a). Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants*, 19(1), 62–69.

Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2002b). Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6975–6980.

Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L., & Chen, C. (2015). 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Experimental cell research*, 334(2), 270-282.

Carson, W. F., Salter-Green, S. E., Scola, M. M., Joshi, A., Gallagher, K. A., & Kunkel, S. L. (2017). Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. *Cellular Immunology*, 314, 63-72.

Castro-Rosas, J., Aguirre-Santos, E. A., Gómez-Aldapa, C. A., Valle-Cervantes, S., Ochoa-Martínez, L. A., Hernández-Santos, B., & Rodríguez-Miranda, J. (2016). Effect of harvest year on the physical properties, chemical composition and cooking time of three common bean varieties that are grown in Mexico. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8(3), 339-348.

Champ, M. M.-J. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3, S307–319.

Chan, C. T., Moore, J. P., Budzyn, K., Guida, E., Diep, H., Vinh, A., ... & Ricardo, S. D. (2012). Reversal of Vascular Macrophage Accumulation and Hypertension by a CCR2 Antagonist in Deoxycorticosterone/Salt-Treated Mice Novelty and Significance. *Hypertension*, 60(5), 1207-1212.

Chan, K., Liu, Z. Q., Jiang, Z. H., Zhou, H., Wong, Y. F., Xu, H. X., & Liu, L. (2006). The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model. *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), 425-432.

Chen, M. L., Shah, V., Patnaik, R., Adams, W., Hussain, A., Conner, D., ... & Hare, D. (2001). Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview. *Pharmaceutical research*, 18(12), 1645-1650.

Chung, Y. C., Hsu, C. K., Ko, C. Y., & Chan, Y. C. (2007). Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. *Nutrition Research*, 27(12), 756-761.

Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2017). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*.

Collins, M. E., & Rastall, R. A. (2008). Oligosaccharides in Food and Agriculture. *Glycoscience*. 1185-1204. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Cook, D. N. (1996). The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology*, 59(1), 61-66.

Costa de Oliveira, A., da Silva Queiroz, K., Helbig, E., Pissini Machado, R. S. M., & Carraro, F. (2001). O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores

de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(3), 276–283.

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867.

Coutin, J. A. F., Munholland, S., Silva, A., Subedi, S., Lukens, L., Crosby, W. L., ... & Bozzo, G. G. (2017). Proanthocyanidin accumulation and transcriptional responses in the seed coat of cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with different susceptibility to postharvest darkening. *BMC plant biology*, 17(1), 89.

Cruz-Bravo, R. K., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Garcia-Gasca, T., Campos-Vega, R., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2011). Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *Journal of Food Science*, 76(2), T41–47.

Cuéllar-Núñez, M. L. (2015). Desarrollo y evaluación nutrimental y nutracéutica de una botana horneada a partir de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.

Cummings, J. H. (2001). The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*, 3, 183-252.

Cummings, J., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227.

Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Wisnewsky, J., ... & André, S. (2014). T Cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: Relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 63(6), 1966-1977.

Darmadi-Blackberry, I., Wahlqvist, M. L., Kouris-Blazos, A., Steen, B., Lukito, W., Horie, Y., & Horie, K. (2004). Legumes: the most important dietary predictor of survival in older people of different ethnicities. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(2), 217-220.

Davatelis, G., Tekamp-Olson, P., Wolpe, S. D., Hermsen, K., Luedke, C., Gallegos, C., ... & Cerami, A. (1988). Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *Journal of Experimental Medicine*, 167(6), 1939-1944.

Davila, A. M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P. H., Sanz, Y., & Tomé, D. (2013). Re-print of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host". *Pharmacological research*, 69(1), 114-126.

de Fátima Viana, S., Guimarães, V. M., José, I. C., e Oliveira, M. G. D. A., Costa, N. M. B., de Barros, E. G., ... & de Rezende, S. T. (2005). Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Food chemistry*, 93(4), 665-670.

De Mejía, E. G., Castaño-Tostado, E., & Loarca-Piña, G. (1999). Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research*, 441(1), 1–9.

De Preter, V., Hamer, H. M., Windey, K., & Verbeke, K. (2011). The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health?. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), 46-57.

Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*, 2(8), 820-833.

Delzenne, N., Cherbut, C., & Neyrinck, A. (2003). Prebiotics: actual and potential effects in inflammatory and malignant colonic diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6(5), 581–586.

Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., & Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of nutrition*, 130(11), 2733-2738.

Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313-326.

Fan, P. H., Zang, M. T., & Xing, J. (2015). Oligosaccharides composition in eight food legumes species as detected by high-resolution mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2228-2236.

Fang, L. Y., Izumi, K., Lai, K. P., Liang, L., Li, L., Miyamoto, H., ... & Chang, C. (2013). Infiltrating macrophages promote prostate tumorigenesis via modulating androgen receptor-mediated CCL4–STAT3 signaling. *Cancer research*, 73(18), 5633-5646.

Farmer, A. D., Mohammed, S. D., Dukes, G. E., Scott, S. M. & Hobson, A. R. (2014). Caecal pH is a biomarker of excessive colonic fermentation. *World Journal of Gastroenterology*, 20(17), 5000 – 5007.

Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J.A., Loarca-Piña, G. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8737–8744.

Feregrino-Perez, A. A., Piñol-Felis, C., Gomez-Arbones, X., Guevara-González, R. G., Campos-Vega, R., Acosta-Gallegos, J., & Loarca-Piña, G. (2014). A non-digestible fraction of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induces cell cycle arrest and apoptosis during early carcinogenesis. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 69(3), 248–254.

Fox, S. I. (2008). Fisiología humana (10th ed.). Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana de España.

Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 281-286.

Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604.

García-Gutiérrez, N. (2015). Efecto de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible del café (*Coffea arábica* L.) usado sobre células de adenocarcinoma humano y su mecanismo de acción. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537–552.

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

García-Urigüen, P. (2012). La alimentación de los mexicanos, cambios sociales y económicos y su impacto en los hábitos alimenticios. *México DF: Cámara Nacional de la Industria de la Transformación*.

Geboes, K. P., De Hertogh, G., De Preter, V., Luybaerts, A., Bammens, B., Evenepoel, P., ... & Verbeke, K. (2006). The influence of inulin on the absorption of nitrogen and the production of metabolites of protein fermentation in the colon. *British journal of nutrition*, 96(6), 1078-1086.

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), 656–661.

Gochman, E., Mahajna, J., Shenzer, P., Dahan, A., Blatt, A., Elyakim, R., & Reznick, A. Z. (2012). The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta histochemica*, 114(8), 827-835.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3(1), 23.

Gouw, V. P., Jung, J., & Zhao, Y. (2017). Functional properties, bioactive compounds, and *in vitro* gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 136-144.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., ... & Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of nutrition*, 134(3), 613-617.

Guzik, T. J., Skiba, D. S., Touyz, R. M., & Harrison, D. G. (2017). The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular research*, 113(9), 1009-1023.

Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J., & Paredes-López, O. (2000). Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1874-1881.

Hacisalihoglu, G., Larbi, B., & Settles, A. M. (2009). Near-infrared reflectance spectroscopy predicts protein, starch, and seed weight in intact seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 702-706.

Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., Li, N. F., Leinster, D. A., Charles, K., ... & Balkwill, F. R. (2005). Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- $\kappa$ B and JNK. *The Journal of Immunology*, *175*(2), 1197-1205.

Hamilton, J. A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, *8*(7), 533.

Henningsson, A. M., Nyman, E. M., & Björck, I. M. (2001). Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. *The British Journal of Nutrition*, *86*(3), 379–389.

Hernández-Salazar, M., Osorio-Diaz, P., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. A. (2010). *In vitro* fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(9), 1417-1422.

Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y., & Hodin, R. A. (2002). The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of Nutrition*, *132*(5), 1012–1017.

Hoover, R., & Zhou, Y. (2003). *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by  $\alpha$ -amylase and resistant starch formation in legumes—a review. *Carbohydrate Polymers*, *54*(4), 401–417.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature protocols*, *2*(9), 2111.

Ilhan, Z. E., Marcus, A. K., Kang, D. W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). pH-Mediated Microbial and Metabolic Interactions in Fecal Enrichment Cultures. *mSphere*, *2*(3), e00047-17.

INEGI: Instituto Nacional de estadística y Geografía [INEGI]. (2015). Inegi.org. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Islas-Gómez, E. (2015). 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*. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.

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

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.

Jamboonsri, P., Pithayanukul, P., Bavovada, R., Leanpolchareanchai, J., Yin, T., Gao, S., & Hu, M. (2015). Factors influencing oral bioavailability of Thai mango seed kernel extract and its key phenolic principles. *Molecules*, 20(12), 21254-21273.

Johnson, C. R., Combs, G. F., & Thavarajah, P. (2013). Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. *Food research international*, 51(1), 107-113.

Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*, 7(4), 2839-2849.

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., & Schwarz, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 255–266.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, *165*(6), 1332-1345.

Kontny, E., & Prochorec-Sobieszek, M. (2013). Articular adipose tissue resident macrophages in rheumatoid arthritis patients: potential contribution to local abnormalities. *Rheumatology*, *52*(12), 2158-2167.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, *9*(16), 1297–1308.

Kulbe, H., Chakravarty, P., Leinster, D. A., Charles, K. A., Kwong, J., Thompson, R. G., ... & Galletta, L. (2012). A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer research*, *72*(1), 66-75.

Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2003). *Robbins Basic Pathology* (7th ed.). Philadelphia, PA: Saunders.

Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, *96*(1), 39-46.

Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2002). Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(22), 6592–6598.

Lampe, J. W., & Chang, J.-L. (2007). Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(5), 347–353.

Le Bourvellec, C., Bureau, S., Renard, C. M., Plenet, D., Gautier, H., Touloumet, L., ... & Simon, S. (2015). Cultivar and year rather than agricultural practices affect primary and secondary metabolites in apple fruit. *PloS one*, *10*(11), e0141916.

Lee, E. Y., Lee, Z. H., & Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, *8*(5), 379-383.

Leterme, P. (2002). Recommendations by health organizations for pulse consumption. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 239-242.

Li, M., Si, L., Pan, H., Rabba, A. K., Yan, F., Qiu, J., & Li, G. (2011). Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. *International journal of pharmaceutics*, 403(1), 37-45.

Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews*, 65(12 Pt 2), S140–146.

Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., & Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 370-375.

Liu, R. H., & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4311-4314.

Lo Turco, V., Potortì, A. G., Rando, R., Ravenda, P., Dugo, G., & Di Bella, G. (2016). Functional properties and fatty acids profile of different beans varieties. *Natural Product Research*, 1–6.

López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators *in vitro*. *Food chemistry*, 212, 282-290.

Luna-Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*, 157, 347–355.

Luzardo-Ocampo, I, A. (2016). Caracterización y evaluación del potencial antiinflamatorio de la fracción no digerible de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido. Proyecto de tesis de Maestría. Programa de Posgrados del Centro de la República, PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro.

Lv, D., Zhang, Y., Kim, H. J., Zhang, L., & Ma, X. (2013). CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(4), 303.

Ma, B. L., Yao, M. K., Zhong, J., Ma, Y. M., Gao, C. L., Wu, J. S., Qiu, F.R., Wang, C.H., Wang, X. H. (2012). Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40(2), 381–388.

Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50-60.

MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15, 323–350. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>

Majno, G., & Joris, I. (2004). *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology*. Oxford University Press.

Malik, S. T. A., Griffin, D. B., Fiers, W., & Balkwill, F. R. (1989). Paradoxical effects of tumour necrosis factor in experimental ovarian cancer. *International journal of cancer*, 44(5), 918-925.

Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77–84.

McCrorry, M. A., Hamaker, B. R., Lovejoy, J. C., & Eichelsdoerfer, P. E. (2010). Pulse Consumption, Satiety, and Weight Management. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 1(1), 17–30.

McLoughlin, R. F., Berthon, B. S., Jensen, M. E., Baines, K. J., & Wood, L. G. (2017). Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, ajcn156265.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.

Mesquita, F. R., Silva, M. I., & Corrêa, A. D. (2016). Thesis Abstract Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines: chemical composition and protein digestibility. *Genetics and molecular research: GMR*, 15(2).

Mgdi, A. O. (2007). Effect of different processing methods on nutrient composition, ant-nutritional factors, and *in vitro* protein digestibility of Dolichos lablab bean (*Lablab purpureus* (L) sweet). *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(4), 299-303.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.

Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. (2015). *In vitro* colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth. *British Journal of Nutrition*, 113(8), 1220-1227.

Mizoguchi, A., Takeuchi, T., Himuro, H., Okada, T., & Mizoguchi, E. (2016). Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology*, 238(2), 205-219.

Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M. A., & de Mejía, E. G. (2015). Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food research international*, 69, 38-48.

Monagas, M., Khan, N., Andrés-Lacueva, C., Urpí-Sardá, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2009). Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British journal of nutrition*, 102(2), 201-206.

Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–142.

Moreno-Jiménez, M. R., Cervantes-Cardoza, V., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Estrella, I., García-Gasca, T. de J., ... Rocha-Guzmán, N. E. (2015). Phenolic composition changes of processed common beans: their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. *Food Research International*, 76, Part 1, 79–85.

Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., ... & García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130(2), 350-355.

Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M. P., Motilva, M. J., & Rubió, L. (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. *Journal of Functional Foods*, 14, 529-540.

Mudryj, A. N., Yu, N., & Aukema, H. M. (2014). Nutritional and health benefits of pulses. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 39(11), 1197-1204.

Murthy, H. N., Dandin, V. S., & Paek, K. Y. (2014). Hepatoprotective activity of ginsenosides from *Panax ginseng* adventitious roots against carbon tetrachloride treated hepatic injury in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 158, 442-446.

Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate polymers*, 68(3), 587-597.

Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., & Fogelman, A. M. (2006). Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*, 2(9), 504–511.

Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., ... & Balkwill, F. R. (1995). The detection and localization of monocyte chemoattractant

protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2391.

Neis, E. P., Dejong, C. H., & Rensen, S. S. (2015). The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients*, 7(4), 2930-2946.

Norma Oficial Mexicana (1999). NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Norma Oficial Mexicana (2002). NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Oberyszyn, T. M. (2007). Inflammation and wound healing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 2993–2999.

Onnainty, R., Schenfeld, E. M., Longhi, M. R., Quevedo, M. A., & Granero, G. E. (2017). Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method with solid-phase extraction for the quantification of hydrochlorothiazide in ex vivo permeation studies. *Biomedical Chromatography*.

Oseguera-Toledo, M. E., de Mejia, E. G., Dia, V. P., & Amaya-Llano, S. L. (2011). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. *Food Chemistry*, 127(3), 1175–1185.

Palafox-Carlos, H., Yahia, E., Islas-Osuna, M. A., Gutierrez-Martinez, P., Robles-Sánchez, M., & González-Aguilar, G. A. (2012). Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135, 7-13.

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

Peñalver, C., Herrera, I. and Tovar, J. (2007). Indigestible starch associated to dietary fiber residues from cooked legume seeds consumed in Venezuela. *Interciencia*, 32: 620–623.

Pérez Ruiz, A., Rodríguez Calzadilla, A., Sanjurjo Gómez, V. M., & Padrón Chacón, R. (1997). El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 34(2), 84-86.

Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(10), 803–815.

Portune, K. J., Beaumont, M., Davila, A. M., Tomé, D., Blachier, F., & Sanz, Y. (2016). Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: the two sides of the coin. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 213-232.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494–507.

Qin, C. C., Liu, Y. N., Hu, Y., Yang, Y., & Chen, Z. (2017). Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World journal of gastroenterology*, 23(17), 3043.

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

Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Tejero, M. E., León-Galván, F., & Loarca-Piña, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International*, 76, 92-104.

Randhir, R., Lin, Y.-T., & Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide

and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(3), 295–307.

Raneva, V., Shimasaki, H., Ishida, Y., Ueta, N., & Niki, E. (2001). Antioxidative activity of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma. *Lipids*, 36(10), 1111-1116.

Rastall, R. A. (2013). Gluco and galacto-oligosaccharides in food: update on health effects and relevance in healthy nutrition. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(6), 675-678.

Rastogi, H., & Jana, S. (2016). Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 41(1), 33-43.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K.P., Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 212–225.

Refsgaard, H. H., Jensen, B. F., Brockhoff, P. B., Padkjær, S. B., Guldbrandt, M., & Christensen, M. S. (2005). In silico prediction of membrane permeability from calculated molecular parameters. *Journal of medicinal chemistry*, 48(3), 805-811.

Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British journal of clinical pharmacology*, 75(3), 588-602.

Reynoso Camacho, R., Ríos Ugalde, M.C., Torres Pacheco, I., Acosta Gallegos, J.A., Palomino Salinas, A.C., Ramos Gómez, M., González Jasso, E., Guzmán

Maldonado, S.H. (2007). El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura Técnica En México*, 33(1), 43–52.

Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, 7.

Rizkalla, S. W., Bellisle, F., & Slama, G. (2002). Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3, S255–262.

Roberfroid, M. B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 406S–409S.

Rodriguez, G. C., Haisley, C., Hurteau, J., Moser, T. L., Whitaker, R., Bast, R. C., & Stack, M. S. (2001). Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor- $\beta$ . *Gynecologic oncology*, 80(2), 245-253.

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 136(1), 206-212.

Romero-Arenas, O., Damián-Huato, M. A., Rivera-Tapia, J. A., Báez-Simón, A., Huerta-Lara, M., & Cabrera-Huerta, E. (2013). The nutritional value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its importance for feeding of rural communities in Puebla, Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(8), 59-65.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*, 340(2), 115-126.

Sandoval-Peraza, M., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero. (2014). Physicochemical and bioactive properties of the fibrous fraction of hard-to-cook black bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa). *Journal of Food and Nutrition Research (ISSN 1336-8672)*, 53(2), 127-136.

Sargi, S. C., Dalalio, M. M. D. O., Visentainer, J. V., Bezerra, R. C., Perini, J. Â. D. L., Stevanato, F. B., & Visentainer, J. E. L. (2012). Production of TNF- $\alpha$ , nitric oxide and hydrogen peroxide by macrophages from mice with paracoccidioidomycosis that were fed a linseed oil-enriched diet. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *107*(3), 303-309.

Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., & Bravo, L. (2000). *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3342–3347.

Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L., & Mañas, E. (1993). Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *Journal of Food Science*, *58*(3), 642-643.

Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J. L., & Goñi, I. (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from *in vitro* colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular nutrition & food research*, *54*(7), 939-946.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*(2), 492-501.

Sayar, S., Jannink, J.L. & White, P. J. (2007). Digestion residues of typical and high  $\beta$ -glucan oat flours provide substrates for *in vitro* fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(13), 5306-5311.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, *14*, 111-125.

Schall, T. J., Jongstra, J., Dyer, B. J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M. M., & Krensky, A. M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *The Journal of Immunology*, *141*(3), 1018-1025.

Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501.

Sengupta, S., Muir, J. G., & Gibson, P. R. (2006). Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1 Pt 2), 209–218.

Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology*, 25, 101–137.

Setchell, K. D. R., Brown, N. M., & Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3577–3584.

Shahidi, F., & Naczk, M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press.

Shellie-Dessert, K. C., & Bliss, F. A. (1991). Genetic improvements of food quality factors. *Common Beans: Research for Crop Improvement*.

Shivappa, N., Hébert, J. R., Rashvand, S., Rashidkhani, B., & Hekmatdoost, A. (2016). Inflammatory Potential of Diet and Risk of Ulcerative Colitis in a Case–Control Study from Iran. *Nutrition and cancer*, 68(3), 404-409.

Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N., & Kaur, A. (2016). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of food science and technology*, 1-13.

Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 81(3), 288-302.

Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1997). Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(5), 327-337.

Solomon, D. H., Massarotti, E., Garg, R., Liu, J., Canning, C., & Schneeweiss, S. (2011). Association between disease-modifying antirheumatic drugs and diabetes risk in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *Jama*, 305(24), 2525-2531.

Sotelo, A., Sousa, H., & Sanchez, M. (1995). Comparative study of the chemical composition of wild and cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 47(2), 93-100.

Stalmach A., Williamson, G., & Crozier, A. (2014). Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food & Function*, 5(8), 1727-1737.

Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.

Tan, C., Wei, H., Zhao, X., Xu, C., Zhou, Y., & Peng, J. (2016). Soluble Fiber with High Water-Binding Capacity, Swelling Capacity, and Fermentability Reduces Food Intake by Promoting Satiety Rather Than Satiation in Rats. *Nutrients*, 8(10), 615. <http://doi.org/10.3390/nu8100615>.

Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol*, 121(91), e119.

Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A., & Campillo, J. E. (2006). White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *The British Journal of Nutrition*, 96(3), 539–544.

Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos Antihipertensivos, Una Alternativa De Tratamiento De Origen Natural: Una Revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2).

- Tosh, S. M., & Yada, S. (2010). Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*, 43(2), 450-460.
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420(6917), 853–859.
- Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D. A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2016). Fortification of Commercial Nixtamalized Maize (*Zea mays* L.) with Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Increased the Nutritional and Nutraceutical Content of Tortillas without Modifying Sensory Properties. *Journal of Food Quality*, 39(6), 569-579.
- Trindade, M. I., Abratt, V. R., & Reid, S. J. (2003). Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 24–32.
- Tsao, L. T., Lee, C. Y., Huang, L. J., Kuo, S. C., & Wang, J. P. (2002). Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by a synthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochemical pharmacology*, 63(11), 1961-1968.
- Tsuda, T., Osawa, T., Ohshima, K., & Kawakishi, S. (1994). Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), 248–251.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 135-138.
- Vergara-Castañeda, H. A., Guevara-González, R. G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A. A., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G. (2010). Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food & Function*, 1(3), 294–300.

Vergara-Castañeda, H., Guevara-González, R., Guevara-Olvera, L., Oomah B., D., Reynoso-Camacho, R., Wiersma, P., & Loarca-Piña, G. (2012). Non-digestible fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates signalling pathway genes at an early stage of colon cancer in Sprague-Dawley rats. *The British Journal of Nutrition*, *108 Suppl 1*, S145–154.

Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In *Phenolic Compound Biochemistry* (pp. 1–34). Springer Netherlands.

Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2008). Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel transgalactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, *88*(5), 1438-1446.

Walton, G. E., van den Heuvel, E. G., Kosters, M. H., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., & Gibson, G. R. (2012). A randomised crossover study investigating the effects of galacto-oligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age. *British Journal of Nutrition*, *107*(10), 1466-1475.

Wang, W., & De Meija, E. G. (2005). A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *4*(4), 63–78.

Winham, D. M., Hutchins, A. M., & Johnston, C. S. (2007). Pinto bean consumption reduces biomarkers for heart disease risk. *Journal of the American College of Nutrition*, *26*(3), 243–249.

Wu, X., Pittman III, H. E., Hager, T., Hager, A., Howard, L., & Prior, R. L. (2009). Phenolic acids in black raspberry and in the gastrointestinal tract of pigs following ingestion of black raspberry. *Molecular nutrition & food research*, *53*(S1).

Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans

(*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4754-4764.

Yoon, J.-H., & Baek, S. J. (2005). Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. *Yonsei Medical Journal*, 46(5), 585–596.

Yoshida, H., Tomiyama, Y., & Mizushima, Y. (2005). Characterization in the Fatty Acid Distributions of Triacylglycerols and Phospholipids in Kidney Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 12(2), 169–180.

Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigné, C., Rayssiguier, Y., & Rémésy, C. (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *The British Journal of Nutrition*, 86(4), 479–485.

Zhang, F., Wang, X., Qiu, X., Wang, J., Fang, H., Wang, Z., ... & Xia, Z. (2014). The protective effect of esculentoside a on experimental acute liver injury in mice. *PLoS one*, 9(11), e113107.

Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M. J. (2011). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12361–12367.

Zhao, J. F., Shyue, S. K., Lin, S. J., Wei, J., & Lee, T. S. (2014). Excess Nitric Oxide Impairs LXR ( $\alpha$ )-ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux in Macrophage Foam Cells. *Journal of cellular physiology*, 229(1), 117-125.

Zhou, Z., Cao, X., & Zhou, J. Y. (2013). Effect of resistant starch structure on short-chain fatty acids production by human gut microbiota fermentation *in vitro*. *Starch-Stärke*, 65(5-6), 509-516.