



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
ANTIDIABÉTICAS DE UNA GALLETA ELABORADA
CON HARINA DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus
vulgaris* L.)”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LAURA JENIFER BECERRIL OCAMPO

DIRIGIDO POR

DRA. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

CO-DIRIGIDO POR

DRA. RAQUEL K. CRUZ BRAVO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
ANTIDIABÉTICAS DE UNA GALLETA ELABORADA
CON HARINA DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus
vulgaris* L.)”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LAURA JENIFER BECERRIL OCAMPO

DIRIGIDO POR

DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

CO-DIRIGIDO POR

DRA. RAQUEL K. CRUZ BRAVO

SINODALES

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
DIRECTORA

Dra. RAQUEL K. CRUZ BRAVO
CO-DIRECTORA

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL

M.C. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1 ANTECEDENTES	1
1.1 Diabetes	1
1.2 Clasificación de diabetes	2
1.2.1 Diabetes tipo 1	2
1.2.2 Diabetes tipo 2	2
1.3 Diagnóstico de diabetes	2
1.4 Complicaciones de la diabetes	3
1.5 Alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes	3
1.5.1 Dislipidemia y riesgo cardiovascular	3
1.6 Tratamiento y prevención	4
1.7 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5
1.7.1 Composición del frijol común	6
1.7.2 Compuestos fitoquímicos	6
1.7.3 Propiedades antidiabéticas del frijol común	8
1.7.4 Consumo de frijol común	9
1.8 Alimentos funcionales a base de frijol común	9
2 HIPÓTESIS	11
3 OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12

4	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1	Materiales	13
4.1.1	Galletas	13
4.1.2	Modelo biológico	13
4.2	Métodos	13
4.2.1	Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol	13
4.2.1.1	Determinación de polifenoles extraíbles	13
4.2.1.1.1	Cuantificación de polifenoles totales	13
4.2.1.1.2	Cuantificación de flavonoides totales	14
4.2.1.2	Cuantificación de saponinas totales	14
4.2.1.3	Cuantificación de fitoesteroles totales	15
4.2.1.4	Análisis del perfil de fitoquímicos por HPLC-DAD-MSD	15
4.2.2	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre los niveles de glucosa en ratas sanas	16
4.2.3	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la tolerancia a la glucosa en ratas sanas	17
4.2.4	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en un modelo de diabetes inducido con una dieta alta en grasa y estreptozotocina	17
4.2.4.1	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la resistencia a la insulina en ratas diabéticas	18
4.2.4.2	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre el perfil de lípidos y riesgo cardiovascular en ratas diabéticas	18
4.2.4.3	Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre marcadores séricos de daño hepático en ratas diabéticas	18
4.2.5	Análisis estadístico	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol	19

5.2 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre los niveles de glucosa en ratas sanas	21
5.3 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la tolerancia a la glucosa en ratas sanas	22
5.4 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en un ratas diabéticas	25
5.4.1 Resistencia a la insulina	25
5.4.2 Riesgo cardiovascular	26
5.4.3 Marcadores séricos de daño hepático	29
6 DISCUSIÓN	31
6.1 Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol	31
6.2 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en un modelo de diabetes	32
7 CONCLUSIONES	37
8 REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus	3
2	Componentes nutricionales del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	7
3	Compuestos fitoquímicos presentes en distintas variedades de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
4	Cuantificación de compuestos fenólicos totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por HPLC-DAD-MSD	20
5	Cuantificación de saponinas totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por HPLC-DAD-MSD	21
6	Cuantificación de fitoesteroles totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por HPLC-DAD-MSD	22
7	Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sobre los niveles séricos de glucosa e insulina, y el estado de resistencia a la insulina en ratas diabéticas	26
8	Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sobre el perfil lipídico e índice aterogénico en ratas diabéticas	28
9	Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sobre marcadores séricos de daño hepático en ratas diabéticas	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Países con mayor número de personas afectadas por diabetes	1
2	Papel de la resistencia a la insulina en la dislipidemia diabética	4
3	Alteración más comunes del metabolismo de lípidos en hígado asociadas a niveles elevados de glucosa en sangre	5
4	Principales consumidores de frijol en el mundo, 2000-2007	9
5	Aporte de glucosa de una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en ratas sanas y área bajo la curva (AUC)	23
6	Ensayo de tolerancia a la glucosa de una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en ratas sanas y área bajo la curva (AUC)	24
7	Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sobre los niveles séricos de proteína C-reactiva en ratas diabéticas	27

RESUMEN

La diabetes se caracteriza por niveles elevados de glucosa como consecuencia de una baja producción y/o actividad de insulina, lo que promueve el desarrollo de dislipidemia, así como daño hepático. Dichas alteraciones pueden ser controladas con el consumo de alimentos funcionales, tales como el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual presenta efectos hipoglucémicos e hipolipidémicos. Por lo tanto, dicha leguminosa se ha utilizado como ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales, como barras, pastas y tortillas. El objetivo de esta tesis fue analizar la composición fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol variedad Pinto Saltillo, y evaluar su efecto en ratas diabéticas inducidas con dieta alta en grasa y estreptozotocina, utilizando una galleta comercial de avena para fines comparativos. La administración oral de 0.4 y 0.6 g/día de galleta con harina de frijol disminuyó los niveles séricos de glucosa (8.8-12.9%) e insulina (12.4-25.3%) en animales diabéticos; así como el pico hiperglucémico en animales sanos tras la administración de una carga de glucosa (36.6-41.1%). Asimismo, dichos tratamientos disminuyeron los niveles séricos de triglicéridos (20.2-28.1%), colesterol (17.6-26.5%), LDL (27.8-31.1%) y proteína C-reactiva (23.0-32.8%), presentando un mayor efecto benéfico que la galleta comercial. Por otro lado, no se observó un efecto hepatoprotector con la administración de las galletas. El efecto hipoglucémico e hipolipidémico de la galleta con harina de frijol fue asociado a su alto contenido de polifenoles, tales como rutina, ácido cafeico y ácido protocatecuico, así como β -sitosterol y soyaaponinas. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la harina de frijol puede ser utilizada como ingrediente nutracéutico para la elaboración de productos horneados tales como galletas, con efecto antidiabético.

1 ANTECEDENTES

1.1 Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles elevados de glucosa en sangre (≥ 126 mg/dL), lo cual es el resultado de alteraciones en la secreción y/o actividad de la insulina (ADA, 2004). El desarrollo de esta enfermedad altera el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos en el organismo (Islas y Revilla, 2005).

Según la Federación Internacional de Diabetes (FID), 8.7 millones de individuos fueron diagnosticados con diabetes en México en 2013 (Figura 1), y se estima que dicha prevalencia se duplicará para el año 2035 (FID, 2013). Asimismo, esta enfermedad es una de las principales causas de muerte nacional y se estima que la tasa de mortalidad crece 3% cada año (Gil y col., 2013).

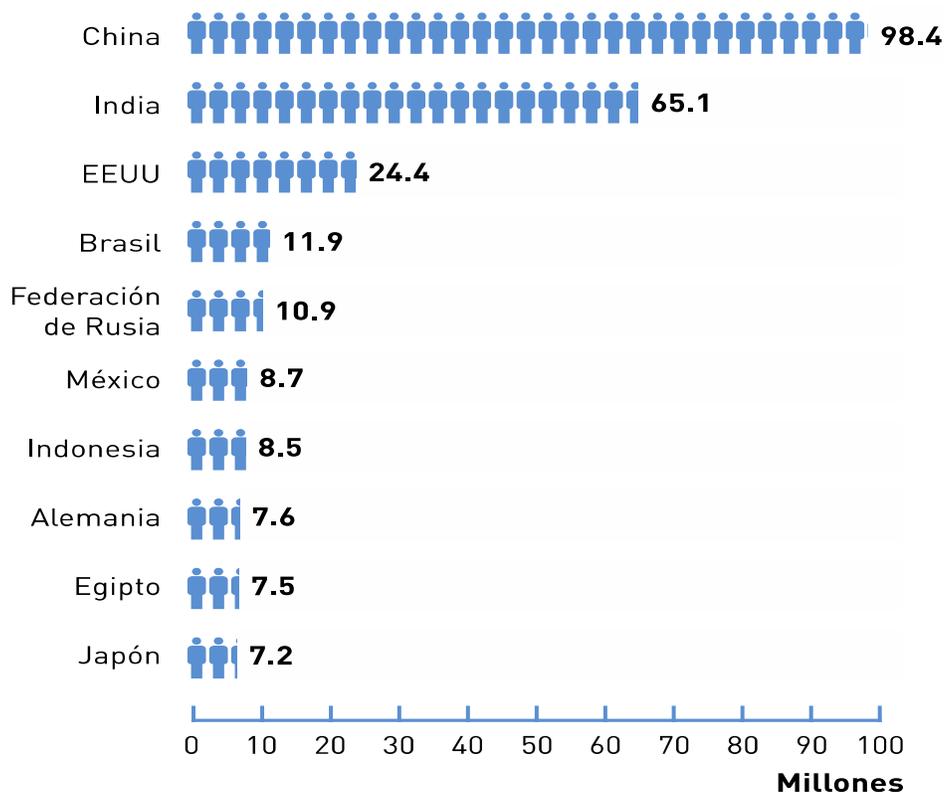


Figura 1. Países con mayor prevalencia de diabetes en el mundo (FDI, 2013).

1.2 Clasificación de diabetes

1.2.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células β pancreáticas, las cuales son responsables de la producción de insulina. Como resultado, se disminuye la producción de esta hormona, así como la internalización de la glucosa en los tejidos insulino-dependientes, tales como tejido adiposo y músculo. Lo anterior promueve la acumulación de glucosa en el torrente sanguíneo, que se refleja en un estado de hiperglucemia. El control de este tipo de diabetes se lleva a cabo por medio de la combinación de terapia de insulina diaria, una dieta saludable y ejercicio físico (Mediavilla, 2010).

1.2.2 Diabetes tipo 2

Durante el desarrollo de la diabetes tipo 2 se presenta una producción de insulina insuficiente, o una disminución en su actividad (resistencia a la insulina), por lo que se promueve la acumulación de glucosa en sangre (FID, 2013). Existen varios factores de riesgo que están relacionados con el desarrollo de diabetes tipo 2, entre ellos la obesidad, la mala alimentación, la inactividad física, la edad avanzada y el grupo étnico. Para controlar este tipo de diabetes no es necesario la administración de insulina ya que, se puede normalizar a través de una dieta sana, actividad física, así como la administración de fármacos para promover sensibilidad a la insulina, incluyendo la disminución de la síntesis de glucosa hepática (FID, 2013).

1.3 Diagnóstico de diabetes

La Asociación Americana del corazón (AHA, por sus siglas en inglés) hace referencia a los criterios recomendados para un diagnóstico correcto de la DM, donde el parámetro a evaluar es la glucosa (Cuadro 1). También se hace referencia a la hemoglobina glucosilada, la cual debe ser usada para monitorear la diabetes en los 3 últimos meses y no para usos de diagnóstico (Giacco y Browleen, 2012).

Cuadro 1. Criterios para el diagnóstico de DM

Parámetro	Valor recomendado
Glucosa en ayuno de 8 horas	≥ 126 mg/dL ó 7 mmol/L
Glucosa al azar	≥ 200 mg/dL ó 11.1 mmol/L
Glucosa a las 2 horas posterior a una carga de 75 g de glucosa anhidra	≥ 200 mg/dL ó 11.1 mmol/L

(Rubio, 2012)

1.4 Complicaciones de la diabetes

Los niveles elevados de glucosa promueven el desarrollo de una serie de complicaciones irreversibles, que de no ser tratadas, provocan la muerte (Reusch, 2003). Los principales órganos afectados por la DM son el corazón y los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y el hígado. Por lo tanto, la diabetes es una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares, ceguera, insuficiencia renal, daño hepático y amputaciones de miembros inferiores (FID, 2013; Nathan, 2015).

1.5 Alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes

1.5.1 Dislipidemia y riesgo cardiovascular

La dislipidemia se caracteriza por un aumento en los niveles séricos de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como por una disminución en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas características se consideran factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Zhang y Lu, 2015). La resistencia a la insulina asociada con el desarrollo de DM tipo 2 promueve la lipólisis de los triglicéridos de tejido adiposo, incrementando los niveles séricos de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) (Zhang y Lu, 2015). Los FFA son transportados principalmente al hígado, promoviendo la producción de triglicéridos y, por lo tanto, su secreción al torrente sanguíneo dentro de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Mooradian, 2009) (Figura 2).

Adicionalmente, niveles elevados de glucosa incrementan la expresión hepática de la proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos (ChREBP), la cual promueve la activación transcripcional de diversos genes involucrados en la síntesis *de novo* o lipogénesis, tales como la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la

sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés) y el esteroil-CoA desaturasa (SCD, por sus siglas en inglés). Asimismo, el incremento en la síntesis de ácidos grasos se ve reflejado en un aumento en la producción de malonil-coA, el cual inhibe la carnitina parmitoil transferasa-1 (CPT-1), proteína responsable del transporte de ácidos grasos a la mitocondria para su catabolismo (Figura 3) (Browning y Horton, 2004).

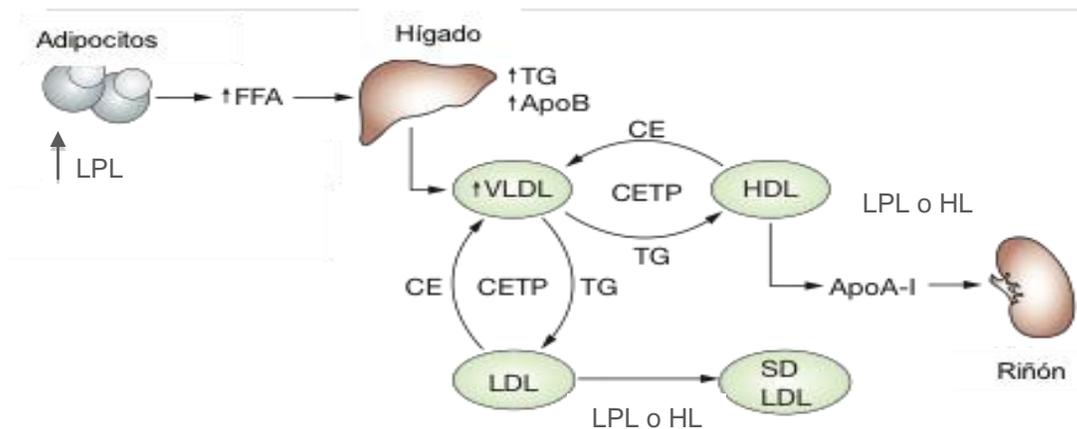


Figura 2. Papel de la resistencia a la insulina en la dislipidemia diabética. ApoA-1: apolipoproteína A-1; ApoB: apolipoproteína B; CE: ésteres de colesterol; CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol; HL: lipasa hepática; LPL: lipoproteína lipasa; SD LDL: lipoproteína de densidad intermedia (Mooradain, 2009).

1.6 Tratamiento y prevención

Hasta el momento, no existe una cura para la diabetes, por lo que el tratamiento farmacológico está enfocado a retrasar o aliviar los síntomas. Los principales fármacos que se utilizan son las biguanidas, las cuales mejoran la señalización de insulina, y las meglitinidas, las cuales restauran la secreción de la insulina. Todos estos medicamentos conllevan a la disminución de los niveles séricos de glucosa postprandial, previniendo los picos hiperglucémicos tras la ingesta de alimentos (Menéndez y col., 2011).

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han publicado que poblaciones donde se consumen dietas como las mediterráneas o vegetarianas, tienen un menor porcentaje de prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas. Dichos

efectos benéficos son atribuidos a la alta concentración de compuestos bioactivos, tales como fibra dietaria, principalmente la fracción soluble, la cual promueve la formación de soluciones viscosas en el intestino, disminuyendo la absorción de nutrientes como glucosa y lípidos. Asimismo, el consumo de compuestos fitoquímicos, tales como fitoesteroles y polifenoles, se han asociado con la inhibición de la digestión y absorción de nutrientes, así como la regulación positiva de la secreción y actividad de la insulina, y la modulación positiva del metabolismo hepático de carbohidratos y lípidos (Pitsavos y col., 2004).

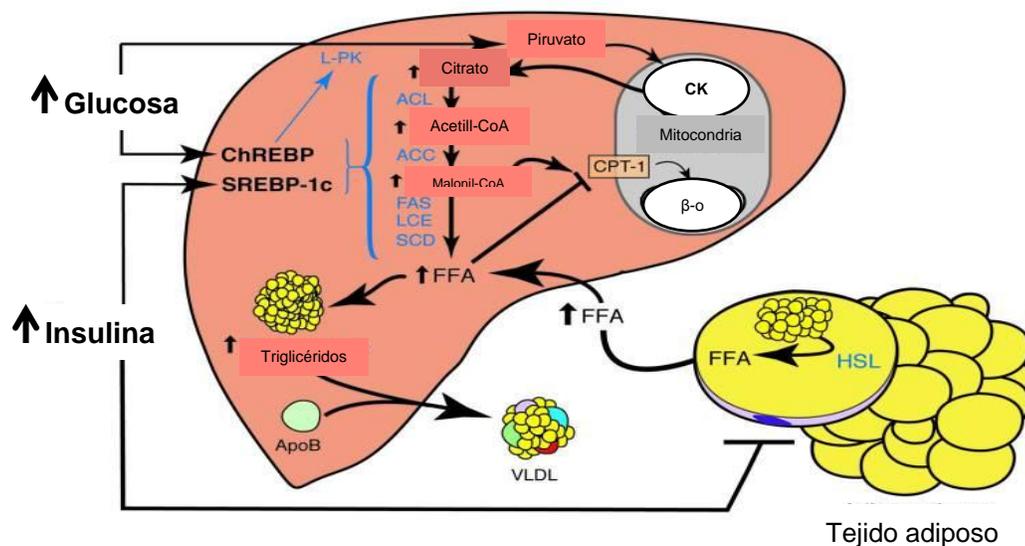


Figura 3. Alteración más comunes del metabolismo de lípidos en hígado asociadas a niveles elevados de glucosa en sangre. β-o: beta oxidación; ACL: ATP citrato liasa; ApoB: apolipoproteína B; CK: ciclo de Krebs; HSL: lipasa sensible a la hormona; SREBP-1c: proteína de unión al elemento regulador de esterol 1-c (Browning y Horton, 2004).

1.7 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento con propiedades antidiabéticas que proporciona beneficios a la salud (alimento funcional), y es la principal leguminosa para consumo humano en muchos países de Latino América y África. El frijol representa un fuente rica en proteínas, vitaminas, minerales, prebióticos y fibra (Bitocchi y col., 2011; Cámara y col., 2013), por lo que es de gran

interés agronómico en todo el mundo. Existen más de 30 especies del género *Phaseolus*, siendo el frijol común el cultivo más ampliamente distribuido (Hnatuszko y col., 2014).

1.7.1 Composición del frijol común

En el Cuadro 2 se presenta la composición química del frijol crudo y cocido. Las proteínas y los carbohidratos son los compuestos mayoritarios presentes en todos los genotipos de frijol común. La proteína de frijol se caracteriza por su deficiencia en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, así como de triptófano. Sin embargo, presenta un elevado nivel de lisina, suficiente para cubrir los requerimientos de niños y adultos de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés). Lo anterior es de gran relevancia, ya que al combinarse con cereales, la mezcla aporta a la dieta proteína de buena calidad, completando las deficiencias en aminoácidos esenciales que representarían por separado (Ramírez, 2010).

El frijol está compuesto por varios tipos de prebióticos, incluyendo el almidón resistente y los galacto-oligosacáridos, tales como estaquiosa, rafinosa y verbascosa, los cuales sirven como sustrato para la fermentación bacteriana en el intestino grueso. Adicionalmente, el frijol es una buena fuente de hierro y calcio, así como de vitaminas B (Cámara y col., 2013). El contenido de lípidos en el frijol son bajos (1–2%), e incluye vitaminas E y K y un alto contenido de ácidos grasos omega-3 (ácido linoleico y ácido alfa-linolénico) (Lisa, 2012).

1.7.2 Compuestos fitoquímicos

El frijol es una fuente rica de fitoquímicos, entre los cuales se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas y fitoesteroles (Cuadro 3), los cuales son considerados antioxidantes naturales. Se ha reportado que las propiedades antioxidantes de estos compuestos pueden proveer diversos beneficios para la salud de sus consumidores, y han sido asociados con la prevención de

enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, tales como la DM tipo 2. Adicionalmente, dichos compuestos ejercen efectos hipoglucémicos e hipolipidémicos, ya que disminuyen la digestión y absorción intestinal de nutrientes, y modulan positivamente el metabolismo de glucosa y ácidos grasos (Sutivisedsak, y col. 2010; Lomas y col., 2015).

Cuadro 2. Componentes nutricionales del frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Nutriente	Valor por 100 g	
	Crudo	Cocido sin sal
Macronutrientes		
Energía	347.00 kcal	143.00 kcal
Proteína	21.42 g	9.01 g
Grasa total	1.23 g	0.65 g
Carbohidratos	62.55 g	26.22 g
Fibra total	15.50 g	9.00 g
Azúcares totales	2.11	0.34 g
Minerales		
Calcio (Ca)	113 mg	46 mg
Hierro (Fe)	5 mg	2 mg
Magnesio (Mg)	176 mg	50 mg
Fósforo (P)	411 mg	147 mg
Potasio (K)	1393 mg	436 mg
Sodio (Na)	12 mg	1 mg
Zinc (Zn)	2 mg	1 mg
Vitaminas		
Vitamina C (ácido ascórbico total)	6.30 mg	0.80 mg
Tiamina	0.71 mg	0.19 mg
Riboflavina	0.21 mg	0.06 mg
Niacina	1.17 mg	0.32 mg
Vitamina B6	0.47 mg	0.23 mg
Folato	0.53 mg	0.17 mg
Vitamina E	0.21 mg	0.94 mg
Vitamina K	5.6 µg	3.5 µg
Lípidos		
Ácidos grasos saturados	0.24 g	0.12 g
Ácidos grasos monoinsaturados	0.23 g	0.13 g
Ácidos grasos poliinsaturados	0.41 g	0.24 g

(Cámara y col., 2013)

1.7.3 Propiedades antidiabéticas del frijol común

Diversos estudios han reportado el efecto hipoglucémico de frijol común en ratas diabéticas, lo cual se ha asociado a un incremento en la secreción pancreática de insulina (Helmstädter, 2010; Ocho-Anin y col., 2010; Hernández y col., 2013; Lomas y col., 2015). Asimismo, dicho efecto se ha asociado con la presencia de inhibidores de α -amilasa en el frijol común, los cuales disminuyen la digestión intestinal de carbohidratos complejos, y por lo tanto su absorción (Ocho-Anin y col., 2010). Por otro lado, se ha reportado que el frijol común disminuye los niveles de colesterol total y LDL, así como los niveles de urea, albúmina y creatinina en orina, por lo que presenta efectos hipolipidémicos y renoprotectores (Hernández y col., 2013; Lomas y col., 2015).

Cuadro 3. Compuestos fitoquímicos presentes en distintas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L).

Polifenoles	Saponinas	Fitoesteroles
Ácido clorogénico	Faseosido I	Δ 7-Estigmasterol
Ácido gálico	Soyasaponina Ba	Campesterol
Ácido protocatecuico	Soyasaponina Bb	β -Sitosterol
Ác. caftárico	Soyasaponina Af	Δ 5-Avenasterol
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Soyasaponina Bd	Δ 5-Avenasterol- β -D-glucósido
Ácido cutárico	Soyasaponina By	β -Campesteril- β -D-glucósido
Ácido cafeico		β -Sitosteril- β -D-glucósido
Ácido siríngico		
Ácido <i>p</i> -cumárico		
Ácido sinápico		
Ácido ferúlico		
Ácido vanílico		
Procianidina B1		
Catequina		
Procianidina B2		
Epicatequina		
Rutina		
Epicatequina galato		
Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido		
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido		
<i>trans</i> -Resveratrol		

(Chávez y col., 2014; Lomas y col., 2015)

1.7.4 Consumo de frijol común

En el año 2009, el consumo mundial de frijol se situó en 15.9 millones de toneladas, cifra superior en 3.8% con respecto al año 2008. México presenta un consumo promedio de esta leguminosa de 1.1 millones de toneladas al año, posicionándose en la tercera posición a nivel mundial (Figura 4) (SE, 2012). Sin embargo, a pesar de los beneficios a la salud asociados al consumo de frijol y a su alto contenido nutrimental, el consumo *per cápita* ha disminuido de 22 a 12 kg en México (SAGARPA, 2008). Esta tendencia podría estar asociada a la urbanización y a los cambios en las preferencias de consumo. Es por ello que se han desarrollado diversos alimentos funcionales y listos para su consumo a base de frijol común.

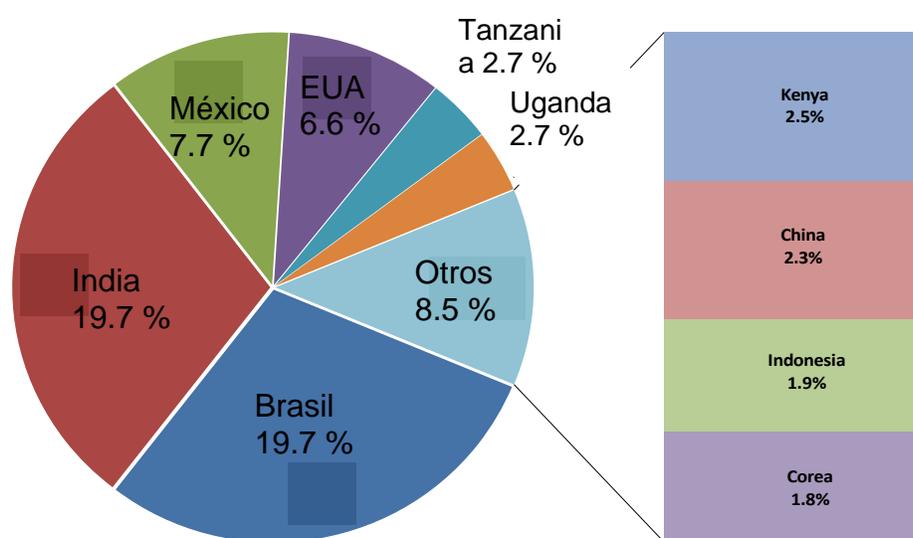


Figura 4. Principales consumidores de frijol en el mundo, 2000-2007 (% con respecto al consumo mundial total) (SE, 2012).

1.8 Alimentos funcionales a base de frijol común

El concepto de alimento funcional nació en Japón y se refiere a los alimentos procesados, consumidos como parte de la dieta normal, y que contienen componentes biológicamente activos (nutraceúticos) que ofrecen el potencial de

mejorar la salud o la reducción del riesgo en el desarrollo de una enfermedad (EUFIC, 2006).

Debido al ritmo de vida agitado, se ha visto la necesidad de incrementar la comercialización de alimentos de fácil consumo. Sin embargo, la mayoría de ellos son de alto contenido energético y perjudiciales para la salud. Por tal motivo, y debido a las propiedades nutricionales y nutracéuticas del frijol común, se han desarrollado alimentos funcionales a base de esta leguminosa. Algunos ejemplos de estos alimentos son barras horneadas de frijol y avena (Ramírez, 2010), espagueti (Gallegos y col., 2010), y tortillas (Grajales y col., 2012). Estos productos han reportado tener un alto contenido en proteínas, fibra y compuestos fitoquímicos, por lo que podrían ser utilizados como adyuvantes en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas, tales como la DM.

2 HIPÓTESIS

El consumo de una galleta elaborada con harina de frijol, debido a su contenido de fitoquímicos, reduce los niveles de glucosa y lípidos en sangre, así como las complicaciones hepáticas asociadas a la diabetes en un modelo animal.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de una galleta elaborada con harina de frijol común sobre la diabetes y sus complicaciones en un modelo animal.

3.2 Específicos

- Cuantificar e identificar los compuestos fitoquímicos de una galleta elaborada con harina de frijol.
- Determinar el efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre los niveles séricos de glucosa e insulina.
- Evaluar el efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre el riesgo cardiovascular.
- Determinar el efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre el daño hepático.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Galletas

Las galletas elaboradas con 23% de harina de frijol Pinto Saltillo fueron obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campus Zacatecas. Se utilizaron galletas de avena sin azúcar sabor vainilla (Quaker) como control comercial.

4.1.2 Modelo biológico

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar de 250 ± 20 g de peso corporal, las cuales se adquirieron en el bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol

4.2.1.1 Determinación de polifenoles extraíbles

Los polifenoles fueron extraídos de las muestras de galleta molidas (0.5 g) con 20 mL de una solución de metanol:agua 50:50 (v/v) a pH 2, la mezcla se agitó durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $5000 \times g$ por 10 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 20 mL de una solución de acetona:agua 70:30 (v/v) al residuo, y se realizó la extracción previamente descrita (Hassan y col., 2011). Finalmente, los sobrenadantes fueron se mezclaron para la cuantificación de polifenoles y flavonoides totales.

4.2.1.1.1 Cuantificación de polifenoles totales

Se mezcló una alícuota de 10 μ L del extracto de polifenoles con 65 μ L de agua destilada y 37.5 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, y se agitó en vórtex por 1 min. Posteriormente, se adicionaron 187.5 μ L de carbonato de sodio al 20% (p/v) y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Se realizó la medición de las absorbancias a 760 nm (Singleton y col.,1999) y los resultados se

expresan como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg GAE/g).

4.2.1.1.2 Cuantificación de flavonoides totales

Se mezcló una alícuota de 100 μ L del extracto de polifenoles con 7.5 μ L de nitrito de sodio al 5% (w/v), 15 μ L de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 50 μ L de hidróxido de sodio 1 M y 77.5 μ L de agua destilada. Se agitó la mezcla en vórtex durante 1 min y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Se realizó la medición de las absorbancias a 510 nm (Heimler y col., 2006) y se expresaron los resultados como mg equivalentes de catequina por g de muestra (mg CE/g).

4.2.1.2 Cuantificación de saponinas totales

Las saponinas fueron extraídas de las muestras molidas (25 mg) con 500 μ L de una solución de metanol al 80% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 14000 x g durante 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionaron 500 μ L de la solución de metanol al 80% (v/v) al residuo, y se realizó la extracción previamente descrita. Finalmente, se mezclaron los sobrenadantes, se evaporaron a sequedad y se re-suspendió la muestra en 200 μ L de metanol. Para la cuantificación de saponinas totales, se tomó una alícuota de 100 μ L de muestra y se le adicionaron 500 μ L de una solución de vainillina al 8 % en etanol (w/v) y 5 mL de una solución de ácido sulfúrico al 72% (v/v). La mezcla se incubó a 60 °C durante 10 min, y posteriormente se enfrió en un baño de hielo. Se realizó la medición de las absorbancias a 538 nm (Hiai y col., 1976) y se expresaron los resultados como mg equivalentes de soyasaponina I por g de muestra (mg SSE/g). La concentración de saponinas totales se estimó por medio de la ecuación 1, en donde Abs: absorbancia, PM: peso molecular (943.12 g/mol), ϵ : coeficiente de extinción molar (5278 1/M·cm) y d: distancia (0.6756 cm).

$$X = (\text{Abs} \times \text{PM}) / (\epsilon \times d) \quad (1)$$

4.2.1.3 Cuantificación de fitoesteroles totales

Las fitoesteroles fueron extraídos de las muestras molidas (25 mg) con 500 μ L de hexano. Las muestras se centrifugaron a 14000 x g durante 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionaron 500 μ L de hexano al residuo, y se realizó la extracción previamente descrita. Finalmente, se mezclaron los sobrenadantes, se evaporaron a sequedad y se re-suspendió la muestra en 200 μ L de metanol. Para la cuantificación de fitoesteroles totales, se tomó una alícuota de 100 μ L de muestra y se le adicionaron 5 mL de una solución de hidróxido de potasio 0.5 M en metanol. La mezcla se incubó a 80 °C durante 60 min. Posteriormente, se adicionaron 1 mL de agua y 2 mL de hexano, se agitó la mezcla en vórtex por 1 min y se centrifugó a 14000 x g durante 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se evaporó a sequedad y se re-suspendió en 40 μ L de isopropanol y 300 μ L del reactivo enzimático para colesterol (SpinReact, Girona, España). Se agitó la mezcla en vórtex por 1 min y se incubó a 35 °C durante 15 min. Se realizó la medición de las absorbancias a 500 nm (Hiai y col., 1976) y se expresaron los resultados como mg equivalentes de β -sitosterol por g de muestra (mg SE/g). La concentración de fitoesteroles totales se estimó por medio de la ecuación 1, en donde $PM=414.71$ g/mol, $\epsilon=11000$ 1/M·cm, y $d=0.2702$ cm.

4.2.1.4 Análisis del perfil de fitoquímicos por HPLC-DAD-MSD

Se utilizaron los extractos de polifenoles, flavonoides y saponinas previamente descritos para el análisis de perfil fitoquímico en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) y un espectrómetro de masas con interfase de ionización por electrospray (ESI-MSD) (Agilent 1100), utilizando una columna Zorbax ODS-18 (15 x 4.6 mm, 5 μ m) a 40 °C. El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización negativa utilizando las siguientes condiciones, voltaje de capilar de 4000 V, presión de nebulizador de 40 psi, flujo de gas nebulizador de 10 L/min, temperatura del gas de nebulizador de 300 °C, voltaje del cuadrupolo de 150 V, voltaje del fragmentador de 130 V. Los espectros de masas se adquirieron en un rango de 80-1200 m/z.

La separación de polifenoles se realizó utilizando como fase móvil agua:ácido fórmico 99:1 (A) y acetonitrilo (B) en condiciones de gradiente: 95/5 (A/B) de 0-20 min, 80/20 de 20-25 min, 60/40 de 25-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min, y se realizó la medición de absorbancias a 280, 320 y 360 nm. La cuantificación de ácidos fenólicos se realizó utilizando estándares de ácidos fenólicos (ácidos clorogénico, gálico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, protocatecuico, cumárico, rosmarínico, ferúlico, sinápico y elágico) y flavonoides (epicatequina, catequina, galocatequín galato, epigalocatequín galato, quercetina, hesperidina y rutina).

La separación de saponinas se realizó utilizando como fase móvil acetonitrilo:ácido fórmico 99.9:0.1 (A) y agua:ácido fórmico 99.9:0.1 (B) en condiciones de gradiente: 75/25 A/B de 0-3 min, 50/50 de 3-20 min, 20/80 de 20-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.4 mL/min, y se realizó la medición de absorbancias a 310 nm. La cuantificación de fue realizada utilizando soyasaponina I como estándar.

La separación de fitoesteroles se realizó utilizando como fase móvil metanol (A) y agua:acetonitrilo 99:1 (B) en condiciones de gradiente: 85/15 A/B de 0-15 min, 100/0 de 15-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min, y se realizó la medición de absorbancias a 205 nm. La cuantificación de fue realizada utilizando β -sitosterol como estándar.

4.2.2 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre los niveles de glucosa en ratas sanas

Se realizó la administración intragástrica de una dosis equivalente a 0.2, 0.4 y 0.6 g/día de galleta con harina de frijol y 0.6 g/día de galleta comercial, y se administró agua destilada al control. Las dosis para este estudio se seleccionaron en base en el consumo de 2 galletas (30 g; 0.2 g/día), 4 galletas (60 g; 0.4 g/día) y 6 galletas

(90 g; 0.6 g/día) por una persona adulta.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de glucosa en la sangre obtenida de la cola a los 0, 30, 60, 90 y 120 min utilizando un glucómetro (Accutrend plus Roche Diagnosis, Mannheim, Alemania). Se calculó el área bajo la curva (AUC) utilizando la función trapezoidal (Allison y col., 1995).

4.2.3 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la tolerancia a la glucosa en ratas sanas

Se realizó la administración intragástrica de las galletas utilizando las dosis descritas anteriormente, seguido de la administración de glucosa (2 g/kg). Se cuantificaron los niveles de glucosa a los tiempos descritos anteriormente, y se calculó el AUC.

4.2.4 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en un modelo de diabetes inducido con una dieta alta en grasa y estreptozotocina

Las ratas se clasificaron en dos grupos: i) control sano, el cual fue alimentado con una dieta estándar y ii) diabético, el cual fue alimentado con una dieta alta en grasa (28%) durante 2 meses. Posteriormente, se realizó la inducción de diabetes a los animales del grupo diabético mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (35 mg/kg en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M a pH 4.5). Los animales que presentaron niveles sanguíneos de glucosa > 200 mg/dL se consideraron diabéticos y se clasificaron en cuatro grupos, los cuales se alimentaron con una dieta alta en grasa suplementada con diferentes concentraciones de galleta con harina de frijol: i) control diabético (dieta alta en grasa), ii) 0.2 g/día, iii) 0.4 g/día, iv) 0.6 g/día, v) galleta comercial a una concentración de 0.6 g/día. Después de seis semanas de tratamiento, se realizó el sacrificio de los animales. Tras un ayuno de 12 horas, los animales se anestesiaron para la extracción de sangre por medio de punción cardiaca. Estas muestras se centrifugaron para obtener suero y se almacenaron a -70 °C.

4.2.4.1 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la resistencia a la insulina en ratas diabéticas

Se llevó a cabo la cuantificación sérica de glucosa por medio de un kit enzimático-colorimétrico (SpinReact, Girona, España) y de insulina por medio de un kit de Elisa (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

4.2.4.2 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre el perfil de lípidos y riesgo cardiovascular en ratas diabéticas

Se llevó a cabo la cuantificación de triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL por medio de kits enzimáticos-colorimétricos (SpinReact) y de proteína C-Reactiva por medio de un kit enzimático (Abcam). El índice aterogénico se estimó por medio de la ecuación 2.

$$\text{Índice aterogénico} = \frac{\text{colesterol total (mg/dL)}}{\text{HDL (mg/dL)}} \quad (2)$$

4.2.4.3 Evaluación del efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre marcadores séricos de daño hepático en ratas diabéticas

Se realizó la cuantificación de alanina aminotransaminasa (ALT), aspartato aminotransaminasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) en suero por medio de kits enzimáticos-colorimétricos (SpinReact).

4.2.5 Análisis estadístico

Los resultados de la caracterización fitoquímica se reportaron como la media \pm desviación estándar, mientras que los datos del estudio *in vivo* se reportaron como media \pm error estándar. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, además se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer, mientras que cuando se comparó contra un control se utilizó la prueba de t de student. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico JMP 10.0.1.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol

El frijol común se considera un alimento funcional por su importante contenido de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles. En el Cuadro 4 se muestra la cuantificación de compuestos fenólicos totales e individuales presentes en la galleta con harina de frijol y en la galleta comercial. La galleta con harina de frijol presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales en comparación con la galleta comercial (27.3 y 78.3%, respectivamente). Con respecto al perfil de polifenoles, se identificaron 10 ácidos fenólicos y 7 flavonoides. Ambas galletas presentaron ácido clorogénico como componente mayoritario, seguido de catequina y epicatequina. Adicionalmente, la galleta con harina de frijol presentó un alto contenido de rutina, la cual no fue detectada en la galleta comercial.

En el Cuadro 5 se observa que la galleta con harina de frijol presentó un mayor contenido de saponinas totales con respecto a la galleta comercial (85.3%). Adicionalmente, 8 saponinas se identificaron en ambas galletas en concentraciones similares, siendo soyasaponina Ba el compuesto mayoritario.

Por otro lado, la galleta con harina de frijol presentó un alto contenido de fitoesteroles totales en comparación con la galleta comercial, esta última presentó un contenido por debajo del límite de detección (Cuadro 6). Sin embargo, el análisis por HPLC-DAD-MSD permitió la identificación de 9 fitoesteroles libres y 3 fitoesteroles glucósidos en ambas galletas, siendo β -campesterol el compuesto mayoritario, seguido de β -sitosteril-3- β -D-glucopiranosido y Δ 5-avenasterol. Adicionalmente, la galleta con harina de frijol presentó un mayor contenido de Δ 7-estigmasterol, β -sitosterol, Δ 7-avenasterol, β -campesteril-3- β -glucopiranosido y estigmasteril-3- β -glucopiranosido en comparación con la galleta comercial.

Cuadro 4. Cuantificación de compuestos fenólicos totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por HPLC-DAD-MSD

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Galleta con frijol	Galleta comercial
Polifenoles totales (mg GAE/g)	-	8.5 ± 0.4 a	6.7 ± 0.4 b
Flavonoides totales (mg CE/g)	-	0.4 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 b
<i>Perfil de polifenoles (ng/g)</i>			
Ácido clorogénico	1.7	1528.4 ± 6.5 b	1767.3 ± 5.7 a
Epicatequina	2.3	192.0 ± 3.7 b	235.1 ± 1.4 a
Catequina	2.7	100.3 ± 3.3 b	190.6 ± 1.6 a
Ácido gálico	3.7	7.6 ± 0.1 a	8.5 ± 0.5 a
Ácido 4-hidroxibenzoico	4.3	43.5 ± 0.8 a	25.3 ± 0.1 b
Ácido cafeico	13.7	24.6 ± 0.3 a	DLD
Protocatecuico	14.3	69.9 ± 0.4 a	2.2 ± 0.0 b
Galocatequín galato	14.8	0.8 ± 0.0 a	DLD
Epigalocatequín galato	15.9	2.0 ± 0.0 b	2.8 ± 0.1 a
Ácido cumárico	16.1	0.8 ± 0.01 b	1.6 ± 0.0 a
Ácido rosmarínico	16.6	DLD	3.8 ± 0.1 a
Quercetina	18.1	38.7 ± 0.2 a	27.2 ± 0.4 b
Ácido ferúlico	18.9	5.2 ± 0.1 a	DLD
Ácido sinápico	21.2	1.3 ± 0.0 a	DLD
Ácido elágico	22.2	14.1 ± 0.5 a	DLD
Hesperidina	23.5	10.9 ± 0.1 a	DLD
Rutina	27.8	107.9 ± 1.5 a	DLD

Los datos son presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de t de student. GAE: equivalentes de ácido gálico, CE: equivalentes de catequina, DLD: debajo del límite de detección.

Cuadro 5. Cuantificación de saponinas totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por HPLC-DAD-MSD

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Galleta con frijol	Galleta comercial
Saponinas totales (mg SSE/g)	-	18.5 ± 1.8 a	9.99 ± 0.86 b
<i>Perfil de saponinas (µg SSE/g)</i>			
Faseosido I	8.4	0.4 ± 0.0 b	0.5 ± 0.0 a
Soyasaponina Ba	12.6	1.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 b
Soyasaponina Bb	15.9	0.3 ± 0.0 b	0.4 ± 0.0 a
Soyasaponina Af	17.2	0.3 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 b
Soyasaponina Bd	19.5	0.3 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 a
Soyasaponina γg	22.4	0.4 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 b
Soyasaponina βg	24.3	0.6 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 b
Soyasaponina αg	24.7	0.4 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 b

Los datos son presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de t de student. SSE: equivalentes de soyasaponina I.

5.2 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre los niveles de glucosa en ratas sanas

Se llevó a cabo la evaluación del aporte de glucosa de las galletas en ratas sanas, para lo cual se realizó la administración equivalente a 0.2, 0.4 y 0.6 g/día de galleta con harina de frijol y 0.6 g/día de galleta comercial, y se realizó del monitoreo de los niveles de glucosa en sangre durante 120 min (Figura 5a). El pico hiperglucémico de los animales tratados con todas las galletas se presentó a los 30 min, siendo la galleta comercial la que presentó el valor más alto de glucosa (160 mg/dL), mientras que no se observó una diferencia significativa entre las tres dosis administradas de galleta con harina de frijol (132.5-136.5 mg/dL). Después de 120 min, todos los animales tratados con las galletas de harina de frijol presentaron niveles de glucosa basales similares al control negativo (98.5-99.5 mg/dL), mientras que los animales tratados con galleta comercial presentaron valores ligeramente mayores (112 mg/dL). Respecto a los valores de AUC, se observan valores

similares entre las tres dosis de galletas de harina de frijol y el control negativo, mientras que la galleta comercial presenta valores más altos de AUC en comparación con el control negativo (22.9%) (Figura 5b).

Cuadro 6. Cuantificación de fitoesteroles totales e individuales presentes en una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por HPLC-DAD-MSD

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Galleta con frijol	Galleta comercial
Fitoesteroles totales (mg SE/g)	-	15.8 ± 2.1 a	DLD
<i>Perfil de fitoesteroles (µg SE/g)</i>			
Brassicasterol	2.1	3.9 ± 0.0 a	3.3 ± 0.0 b
Ergosterol	2.3	2.7 ± 0.0 a	1.2 ± 0.0 b
Fucosterol	2.7	4.0 ± 0.0 a	2.1 ± 0.0 b
Δ5-Avenasterol	3.8	10.7 ± 0.1 a	7.3 ± 0.0 b
Δ7-Estigmasterol	6.3	7.9 ± 0.0 a	4.8 ± 0.0 b
β-Sitosterol	7.3	12.6 ± 0.2 a	1.4 ± 0.0 b
β-Campesterol	8.7	23.5 ± 0.0 a	13.7 ± 0.7 b
Δ7-Avenasterol	16.9	6.9 ± 0.1 a	1.8 ± 0.0 b
Estigmastanol	17.1	4.8 ± 0.0 b	5.7 ± 0.0 a
β-Sitosteril-3-β-D-glucopiranosido	19.3	18.4 ± 0.1 a	12.1 ± 0.0 b
β-Campesteril-3-β-D-glucopiranosido	20.4	3.9 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 b
Estigmasteril-3-β-D-glucopiranosido	20.7	3.5 ± 0.0 a	1.7 ± 0.0 b

Los datos son presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de t de student. SE: β-sitosterol, DLD: debajo del límite de detección.

5.3 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre la tolerancia a la glucosa en ratas sanas

Se realizó la evaluación del efecto de las galletas sobre tolerancia a la glucosa en ratas sanas, a las cuales se administraron las dosis de cada galleta, seguido de

una carga de glucosa, y se llevó a cabo el monitoreo de los niveles de glucosa en sangre durante 120 min (Figura 6a). El pico hiperglucémico de todos los animales se presentó a los 30 min, siendo la galleta comercial la que presentó el valor más alto de glucosa (205 mg/dL). Por otro lado, los animales tratados con la dosis baja de la galleta con harina de frijol (0.2 g/día) presentaron niveles de glucosa similares al control negativo, mientras que las dosis intermedia y alta de galleta con harina de frijol (0.4 y 0.6 g/día) disminuyeron el pico hiperglucémico en comparación con el control negativo (10.9 y 13.8%, respectivamente).

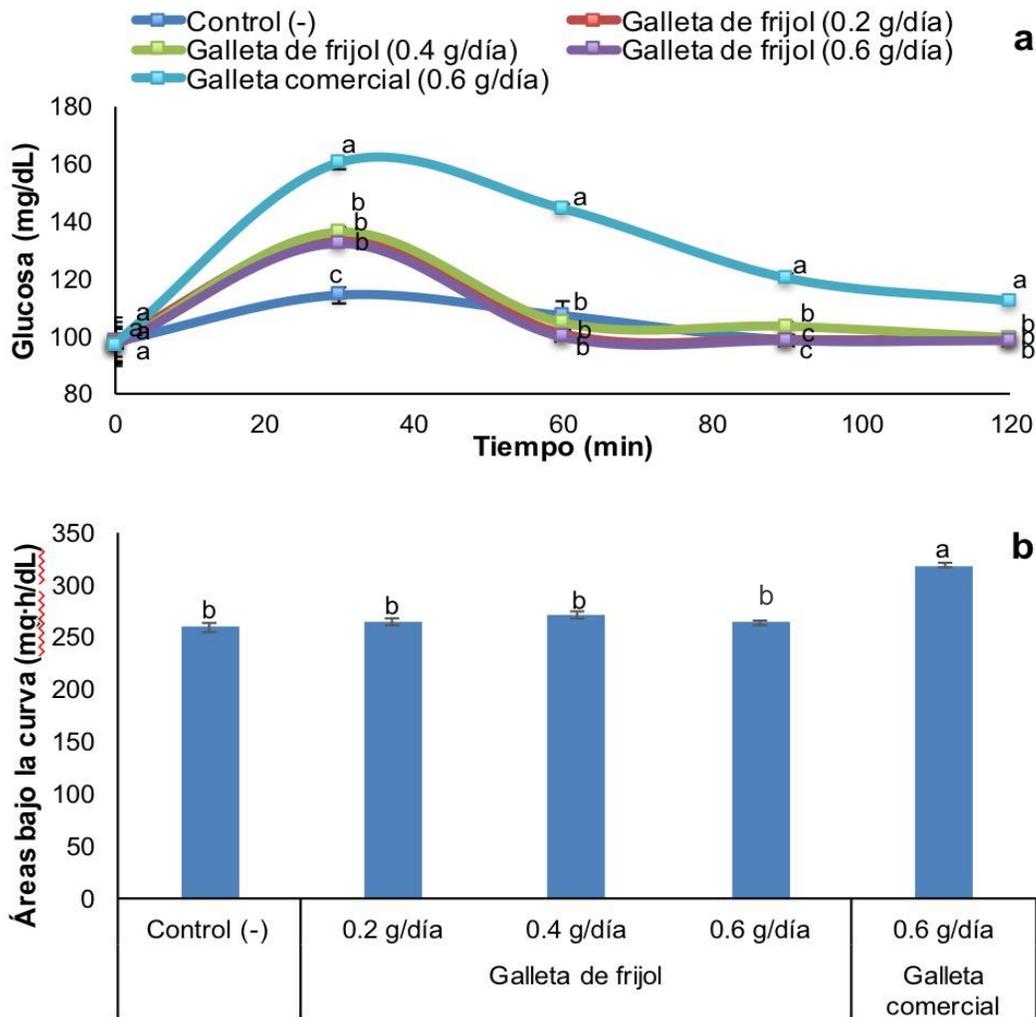


Figura 5. Glucosa en suero de ratas sanas tratadas con galletas elaboradas con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). (a) y área bajo la curva (AUC) (b). Los datos son presentados como media \pm error estándar (n=4). Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

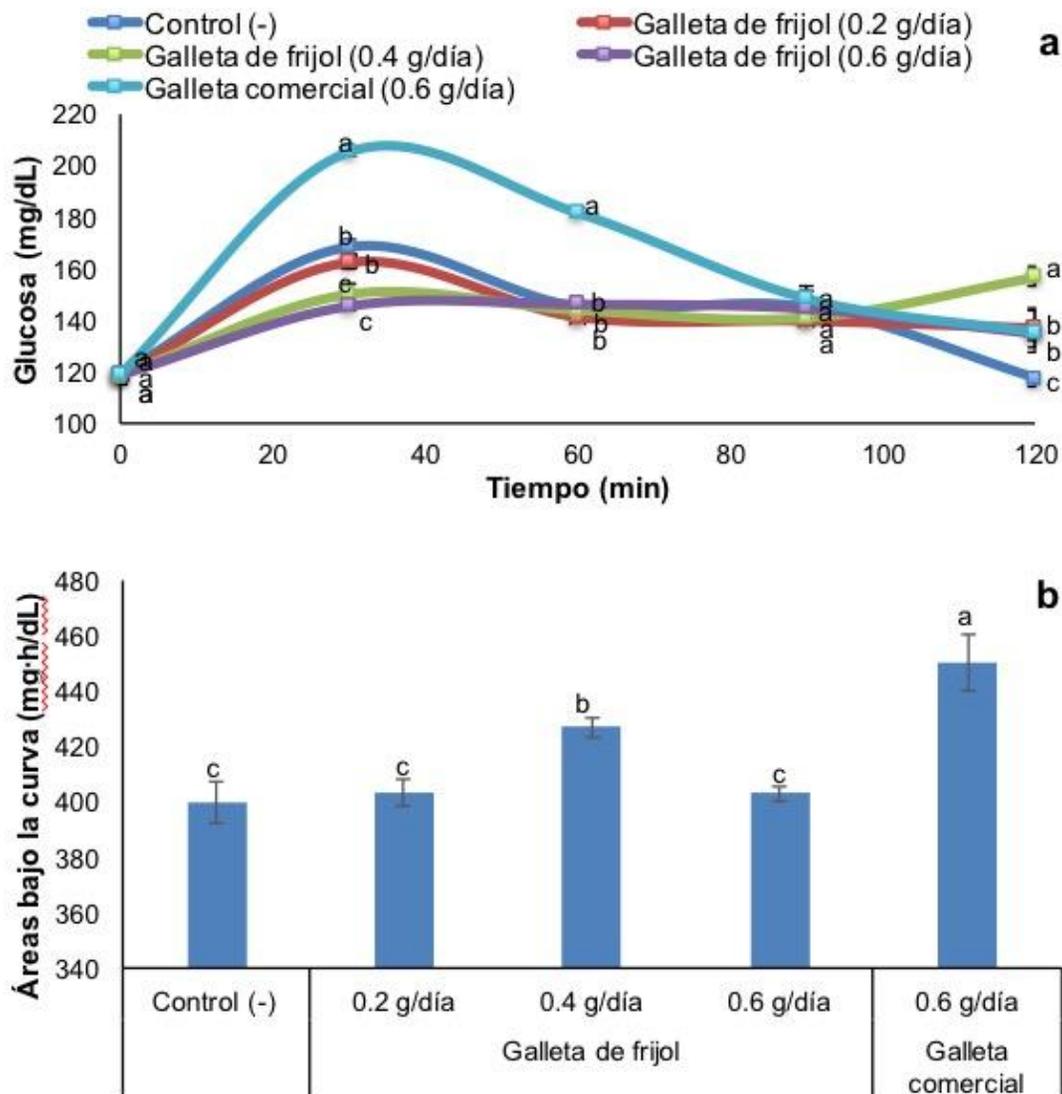


Figura 6. Tolerancia a la glucosa en ratas sanas tratadas con galletas elaboradas con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). (a) y área bajo la curva (AUC) (b). Los datos son presentados como media \pm error estándar (n=4). Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Después de 120 minutos, el control negativo presentó niveles de glucosa basales (117 mg/dL); sin embargo, ninguno de los tratamientos logró esta normalización (135-157 mg/dL). Los animales tratados con la dosis baja y alta de la galleta con harina de frijol (0.2 y 0.6 g/día, respectivamente) presentaron valores de AUC estadísticamente similares al control negativo, mientras que los animales tratados con la dosis intermedia de galleta con harina de frijol (0.4 g/día) presentaron un

aumento en los niveles de glucosa a los 120 min. Por otro lado, la administración de la galleta comercial (0.6 g/día) incrementó de manera significativa los valores de AUC en comparación con el control negativo (12.5%) (Figura 6b).

5.4. Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en ratas diabéticas

5.4.1 Resistencia a la insulina

Se evaluó el efecto de la galleta con harina de frijol en un modelo de diabetes inducida con una dieta alta en grasa y estreptozotocina. En el Cuadro 7 se presentan los resultados correspondientes a la determinación de los niveles de glucosa e insulina en suero. El grupo control diabético presentó un incremento significativo en los niveles séricos de glucosa en comparación con el grupo control sano (2.4 veces), así como una disminución en los niveles de insulina (1.4 veces).

Los animales tratados con la dosis baja de la galleta con harina de frijol (0.2 g/día) y con la galleta comercial (0.6 g/día) presentaron un incremento en los niveles séricos de glucosa con respecto al grupo control diabético (6.3 y 9.5%, respectivamente), mientras que los animales tratados con la dosis intermedia y alta (0.4 y 0.6 g/día) presentaron una disminución en dichos valores (~1.1 veces). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Con respecto a los niveles séricos de insulina, todos los grupos tratados con la galleta con harina de frijol y galleta comercial mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control diabético (1.1-1.3 veces), siendo la dosis alta de galleta con harina de frijol (0.6 g/día) la que presentó el mayor efecto benéfico.

Cuadro 7. Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre los niveles séricos de glucosa e insulina en ratas diabéticas

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)
Control sano	134.2 ± 4.8 c	1.0 ± 0.0 a
Control diabético	319.9 ± 27.2 ab	0.6 ± 0.0 d
Galleta con frijol (0.2 g/día)	340.2 ± 20.6 a	0.7 ± 0.0 c
Galleta con frijol (0.4 g/día)	291.8 ± 11.3 ab	0.7 ± 0.0 c
Galleta con frijol (0.6 g/día)	278.5 ± 15.1 ab	0.8 ± 0.0 b
Galleta comercial (0.6 g/día)	350.3 ± 14.6 a	0.7 ± 0.0 c

Los datos son presentados como media ± error estándar (n=7). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p<0.05$) por la prueba de Tukey. UA: unidades arbitrarias.

5.4.2 Riesgo cardiovascular

El grupo control diabético presentó un incremento significativo en los niveles séricos de triglicéridos (1.8 veces), colesterol total (1.6 veces) y LDL (1.5 veces), así como una disminución significativa en los niveles de HDL (1.4 veces) con respecto al grupo control sano, lo cual se vio reflejado en un incremento del índice aterogénico (2.6 veces), sugiriendo el desarrollo de alteraciones cardiovasculares (Cuadro 8). Asimismo, el grupo control diabético presentó un incremento significativo en los niveles de proteína C-reactiva (2.4 veces) con respecto al control sano (Figura 7).

La administración de 0.4 y 0.6 g/día de galleta con harina de frijol disminuyó significativamente ($p<0.05$) los niveles séricos de triglicéridos (1.2 y 1.3 veces, respectivamente), colesterol total (1.2 y 1.3 veces, respectivamente), colesterol LDL (~1.3 veces), e incrementó los niveles de HDL (1.5 y 1.7 veces, respectivamente) con respecto al grupo control diabético. Mientras que la dosis baja de galleta con harina de frijol (0.2 g/día) únicamente disminuyó los niveles de LDL (1.1 veces) e incrementó HDL (1.3 veces). Por otro lado, los animales tratados con la galleta

comercial (0.6 g/día) presentaron niveles séricos de triglicéridos, colesterol total y LDL similares al grupo control diabético, mientras que presentaron una disminución significativa de HDL (1.5 veces).

Con respecto al índice aterogénico, la administración de todos los tratamientos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) dichos valores con respecto al grupo control diabético (1.4-2.4 veces), siendo que la dosis alta de galleta con harina de frijol (0.6 g/día) presentó el mayor efecto benéfico, al tener valores similares al grupo control sano. Por otra parte, los grupos de animales tratados con la dosis intermedia y alta de galleta con harina de frijol (0.4 y 0.6 g/día), así como con la galleta comercial (0.6 g/día), presentaron una disminución significativa en los niveles de proteína C-reactiva (1.2-1.3 veces), observándose el mayor efecto benéfico con la dosis alta de galleta con harina de frijol (0.6 g/día) (Figura 7).

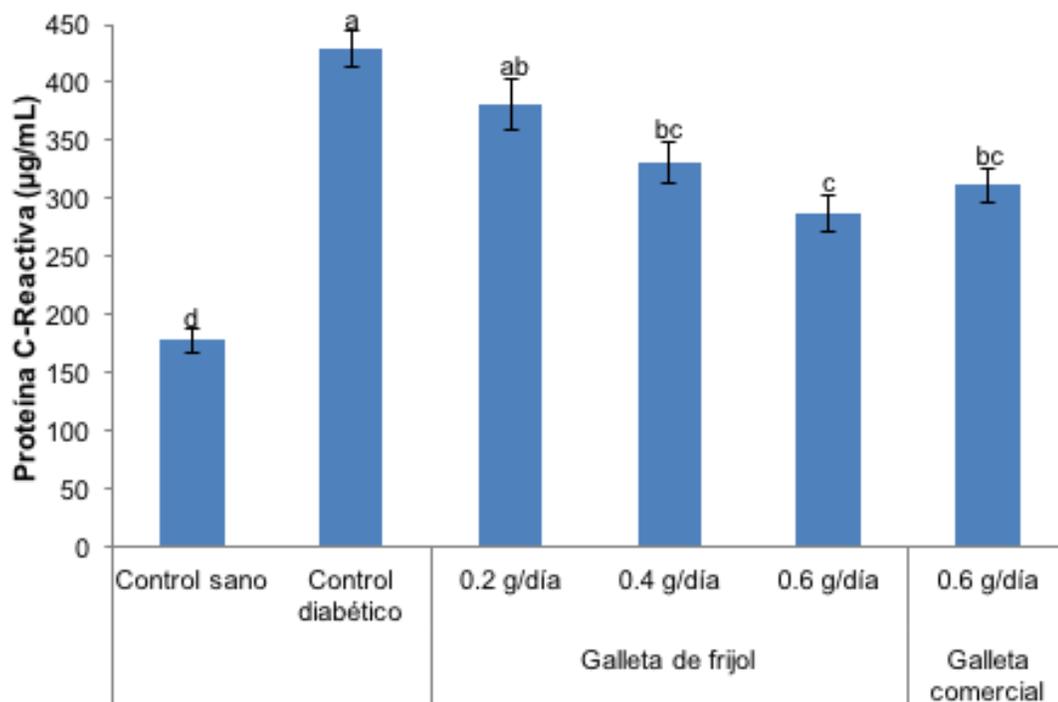


Figura 7. Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre los niveles séricos de proteína C-reactiva en ratas diabéticas. Los datos son presentados como media \pm error estándar (n=7). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Cuadro 8. Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el perfil lipídico e índice aterogénico en ratas diabéticas.

Grupo	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)	Índice aterogénico (UA)
Control sano	82.6 ± 2.6 c	36.5 ± 1.8 d	58.7 ± 1.0 d	34.9 ± 2.1 ab	1.1 ± 0.1 d
Control diabético	150.3 ± 5.6 a	57.8 ± 1.6 a	90.1 ± 1.2 a	20.3 ± 0.6 d	2.9 ± 0.1 a
Galleta con frijol (0.2 g/día)	161.8 ± 3.5 a	53.9 ± 1.8 ab	77.7 ± 0.7 b	26.4 ± 1.7 c	2.1 ± 0.1 b
Galleta con frijol (0.4 g/día)	120.0 ± 8.4 b	47.6 ± 1.0 bc	65.0 ± 0.4 c	30.9 ± 1.4 bc	1.6 ± 0.1 c
Galleta con frijol (0.6 g/día)	108.0 ± 5.5 b	42.5 ± 1.4 cd	62.1 ± 0.6 cd	35.4 ± 0.7 ab	1.2 ± 0.0 d
Galleta comercial (0.6 g/día)	158.4 ± 5.4 a	52.6 ± 1.8 ab	86.4 ± 1.6 a	29.8 ± 0.6 bc	1.8 ± 0.1 bc

Los datos son presentados como media ± error estándar (n=7). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey. UA: unidades arbitrarias.

5.4.3 Marcadores séricos de daño hepático

En el Cuadro 9 se presentan los resultados correspondientes a la determinación de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, alanina aminotransaminasa y aspartato aminotransferasa (ALP, ALT y AST, respectivamente). El grupo control diabético presentó un incremento significativo ($p<0.05$) en la actividad de ALP (3.0 veces) y ALT (1.5 veces) con respecto al grupo control sano, mientras que para la actividad de AST no se observó una diferencia significativa.

Los animales tratados con ambas galletas presentaron un incremento en la actividad de ALP (1.2-1.5 veces), siendo que la dosis intermedia y alta de galleta con harina de frijol fueron las que presentaron los valores más altos. Por otro lado, la administración de galleta con harina de frijol disminuyó la actividad de ALT en comparación con el grupo control diabético (~1.2 veces), mientras que los animales tratados con galleta comercial presentaron un incremento en la actividad de ALT (1.2 veces); sin embargo, no se observó una diferencia significativa ($p<0.05$). Con respecto a AST, la administración de todas las dosis de galletas de harina frijol disminuyó significativamente ($p<0.05$) este parámetro (1.4-1.5 veces), presentando un efecto similar entre los tratamientos; mientras que no se observó una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los animales tratados con la galleta comercial, el grupo control diabético y el grupo sano.

Cuadro 9. Efecto de una dieta suplementada con una galleta elaborada con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre marcadores séricos de daño hepático en ratas diabéticas.

Grupo	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Control sano	87.5 ± 3.8 d	12.8 ± 0.6 c	38.4 ± 2.1 a
Control diabético	264.0 ± 16.0 c	18.9 ± 2.1 ab	39.7 ± 3.3 a
Galleta con frijol (0.2 g/día)	328.4 ± 16.1 bc	15.5 ± 0.8 b	22.6 ± 1.3 c
Galleta con frijol (0.4 g/día)	400.6 ± 24.5 a	15.4 ± 1.1 b	21.0 ± 1.1 c
Galleta con frijol (0.6 g/día)	393.9 ± 37.6 a	14.8 ± 1.1 b	21.1 ± 3.7 c
Galleta comercial (0.6 g/día)	349.7 ± 17.4 ab	22.3 ± 2.3 a	34.7 ± 2.9 ab

Los datos son presentados como media ± error estándar (n=7). Las letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey. ALP: fosfatasa alcalina. ALT: alanina aminotransferasa. AST: aspartato aminotransferasa.

6 DISCUSIÓN

6.1 Caracterización fitoquímica de una galleta elaborada con harina de frijol

En este estudio se evaluó el efecto antidiabético de una galleta elaborada con harina de frijol común, utilizando un galleta comercial de avena con fines comparativos. Tanto el frijol común, como la avena, son considerados alimentos funcionales debido a su importante contenido de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles, entre otros, los cuales son responsables de su efecto antidiabético (Lomas y col., 2015; Belobrajdic y Bird, 2013). Por lo tanto, se llevó a cabo la cuantificación de compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles totales e individuales.

La galleta con harina de frijol presentó un mayor contenido de fitoquímicos totales con respecto a la galleta comercial. La galleta con harina de frijol presentó ácido clorogénico, epicatequina, catequina y rutina como polifenoles mayoritarios, los cuales han sido identificados previamente en frijol común cocido (Espinosa y col., 2006), y se ha reportado que presentan efectos hipoglucémicos en ratas diabéticas (Kamalakkanan y Prince, 2006; Matsui y col., 2007; Ong y col., 2012). Por otro lado, la galleta comercial presentó un alto contenido de ácido clorogénico, epicatequina y catequina. Los principales polifenoles reportados en avena cruda son vanillina y ácido cumárico (Chen y col., 2004), sin embargo éste último fue identificado como compuesto minoritario en la galleta comercial.

Por otro lado, ambas galletas presentaron un perfil de saponinas similar, siendo soyasaponina Ba (V) el compuesto mayoritario, seguido por soyasaponina Bb (I). Dichos compuestos pertenecen al grupo de saponinas B, las cuales se caracterizan por presentar un grupo glucósido unido al C-3 y un grupo hidroxilo unido al C-22 (Guajardo y col., 2012). Se ha reportado que las saponinas presentan diversos efectos benéficos a la salud, tales como antioxidantes e hipoglicémicos (Oishi y col., 2007).

La galleta con harina de frijol presentó una mayor concentración de fitoesteroles totales en comparación con la galleta comercial, siendo los principales compuestos identificados en ambas galletas β -campesterol, sitosteril-3- β -D-glucopiranosido y Δ 5-avenasterol, así como el β -sitosterol en la galleta con harina de frijol. Se ha reportado el β -sitosterol como el fitoesterol mayoritario en frijol común crudo (Chávez y col., 2014); sin embargo, la galleta con harina de frijol presentó β -campesterol como componente principal. Asimismo, se ha reportado que β -sitosterol y Δ 7-avenasterol son fitoesteroles mayoritarios en avena (Halima y col., 2015), sin embargo, estos compuestos fueron identificados como componentes minoritarios en la galleta comercial.

Se ha reportado que el consumo de 2 g/día de dichos compuestos bioactivos reduce significativamente los niveles de colesterol y LDL en plasma, así como el riesgo cardiovascular (NCEP, 2001; FDA, 2010). Adicionalmente, se ha reportado que la administración oral de β -sitosterol (10-20 mg/kg) disminuye los niveles séricos de glucosa y mejora el estado antioxidante en ratas diabéticas (Gupta y col., 2011). Es importante mencionar que las diferencias observadas en el perfil fitoquímico de las galletas en estudio, en comparación con lo reportado para frijol común y avena, podría estar relacionado con la formulación de las galletas, así como el proceso de horneado.

6.2 Efecto de una galleta elaborada con harina de frijol sobre las alteraciones metabólicas en un modelo de diabetes

La diabetes es un trastorno metabólico que se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónica, y es consecuencia de una deficiencia en la producción de insulina o una incapacidad del organismo para utilizarla eficazmente. Esta enfermedad puede controlarse a través de la reducción de los niveles sanguíneos de glucosa y, por lo tanto, la prevención del desarrollo de las complicaciones de esta enfermedad. Se ha reportado que algunos fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles, tienen propiedades antidiabéticas

que pueden ayudar a reducir las complicaciones de esta enfermedad (Adams y Standridge, 2006). Por lo tanto, el alto contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas y fitoesteroles en ambas galletas sugiere que éstas podrían presentar un efecto benéfico sobre el desarrollo de diabetes.

El tratamiento con 0.6 g/día de galleta con harina de frijol presentó el mayor efecto hipoglucémico en ratas diabéticas, lo que podría estar relacionado con una mayor producción/secreción de insulina. Adicionalmente, en el estudio agudo de tolerancia a la glucosa, los animales sanos tratados con una dosis equivalente a 0.6 g/día de galleta con harina de frijol presentaron una reducción significativa en el pico hiperglucémico. Por lo tanto, el efecto hipoglucemiante de dicha dosis también podría estar relacionado con una menor absorción intestinal de glucosa.

El efecto hipoglucemiante de la galleta con harina de frijol podría estar relacionado con su alto contenido de compuestos fitoquímicos. Se ha reportado que rutina disminuye los niveles séricos de glucosa en ratas diabéticas por medio de la inhibiendo de enzimas hepáticas involucradas en glucólisis y gluconeogénesis, tales como hexocinasa, glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bifosfatasa, lo que se ve reflejado en una menor producción de glucosa hepática (Kamalakkannan y Prince, 2006). Por otro lado, la administración de ácidos cafeico y protocatecuico incrementa la internalización de glucosa en adipocitos por medio del aumento en la expresión del transportador de glucosa-4 (GLUT4) (Hsu y col., 2000; Scazzochio y col., 2011). Por su parte, el β -sitosterol incrementa la fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP en la subunidad α (AMPK α) y de acetyl-CoA carboxilasa (ACC), estimulando la captación de glucosa en células musculares (Hwang y col., 2008); mientras que las saponinas mejoran la respuesta a insulina en ratas diabéticas (Liu y col., 2006).

Por otro lado, la galleta comercial incrementó los niveles séricos de glucosa en ratas diabéticas, presentando un efecto perjudicial. Sin embargo, se ha reportado que los compuestos mayoritarios identificados en la galleta comercial presentan efectos hipoglucémicos. Por ejemplo, el ácido clorogénico estimula el transporte de

glucosa en músculo esquelético en ratones diabéticos, e inhibe la captación intestinal de este monosacárido (Johnston y col., 2003; Ong y col., 2012). Asimismo, el ácido clorogénico estimula la secreción de insulina en células pancreáticas (Tousch y col., 2008), disminuye la actividad de glucosa-6-fosfatasa, disminuyendo la producción de glucosa hepática (Jin y col., 2015). Por otro lado, la catequina y la epicatequina inhiben la actividad de α -glucosidasa, enzima involucrada en la digestión intestinal de carbohidratos (Matsui y col., 2007). Además, la catequina aumenta la sensibilidad a la insulina (Vázquez y col., 2015). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el efecto benéfico de los compuestos bioactivos de la galleta comercial no contrarresta el efecto perjudicial del alto aporte de glucosa de dicha galleta, ya que se observó un incremento significativo en el pico hiperglucémico de ratas sanas tras su administración, con o sin la carga de glucosa.

Una de las principales complicaciones de la diabetes es la dislipidemia, la cual se caracteriza por un aumento en los niveles séricos de triglicéridos, colesterol y LDL, así como por una disminución en los niveles de HDL, y se considera un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Zhang y Lu, 2015). Por lo tanto, se evaluó el efecto hipolipidémico de la galleta con harina de frijol.

La administración de la dosis intermedia y alta de la galleta con harina de frijol (0.4 g/día y 0.6 g/día) disminuyó significativamente los niveles séricos de triglicéridos, colesterol y LDL e incrementó los niveles de HDL, lo que se vio reflejando en la reducción significativa del índice aterogénico, presentando un mayor efecto protector que la galleta comercial. Asimismo, dichos tratamientos disminuyeron los niveles séricos de proteína C-reactiva, la cual se considera un factor de riesgo cardiovascular. Este efecto hipolipidémico y cardioprotector podría estar relacionado con la presencia de diversos compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles. Se ha reportado que la administración de rutina y ácido protocatecuico disminuye la expresión de enzimas lipogénicas, tales como sintasa de ácidos grasos (FAS), acetil-CoA carboxilasa (ACC), esteril-CoA desaturasa (SCD) y HMG-

CoA reductasa (HMGCR) (Liu y col., 2010; Wu y col., 2011). Por otro lado, los compuestos β -sitosterol, sitosteril-3- β -glucopiranosido (glucósido de β -sitosterol) y diversas soyasaponinas, reducen la solubilidad del colesterol en las micelas intestinales, ya que compiten con el colesterol en la formación de dichas micelas, disminuyendo su absorción intestinal. Además, se ha demostrado que los fitoesteroles de frijol común disminuyen la lipogénesis hepática vía la inhibición de la proteína de unión al elemento de respuesta de esteroides (SREBP-1) y FAS. (Jesch y Carr, 2006; Chávez y col., 2013; Chávez y col., 2014; Ramírez y col., 2015).

Adicionalmente, el efecto hipolipidémico de la dosis alta de harina de frijol (0.6 g/día) podría estar relacionado con su actividad hipoglucémica, debido a que la glucosa promueve la actividad de la proteína de unión del elemento de respuesta a carbohidratos 1 (ChREBP-1), la cual promueve la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, tales como FAS, SCD y ACC, los cuales incrementan los niveles de triglicéridos en suero (Dentin y col., 2006).

Por otro lado, la galleta comercial únicamente mejoró los niveles séricos de HDL, lo que se vio reflejado en una disminución del índice aterogénico, asimismo disminuyó los niveles séricos de proteína C-reactiva. Sin embargo, se ha reportado que la administración de avena (componente principal de la galleta comercial) no incrementa significativamente los niveles séricos de HDL ni presenta efectos anti-inflamatorios (McGeoch y col., 2013; Thies y col., 2014). Asimismo, los compuestos mayoritarios identificados en la galleta comercial, tales como el ácido clorogénico, la catequina y la epicatequina, no han sido evaluados sobre dichos efectos.

La diabetes genera el desarrollo de varias complicaciones, tales como daño hepático, el cual es consecuencia del estrés oxidativo e inflamación provocados por la hiperglicemia. La hiperglicemia incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN), provocando un aumento en la activación del factor nuclear (NF- κ B), el cual promueve la síntesis de citocinas pro-inflamatorias,

tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL 6) (Elmarakby y Sullivan, 2012).

En hígado, las ERO/ERN y citocinas inflamatorias desencadenan la disfunción mitocondrial de los hepatocitos, provocando la muerte celular mediante apoptosis y necrosis, lo que resulta en la liberación al plasma de varias enzimas, tales como ALT, AST y ALP, las cuales son consideradas marcadores de daño hepático (Schwabe y Brenner, 2006). En consecuencia, el grupo control diabético presentó un incremento en la actividad sérica de ALP y ALT, sugiriendo el desarrollo de lesiones hepáticas tempranas.

No se observó una tendencia clara en el efecto de ambas galletas sobre el daño hepático, ya que la suplementación con las dos galletas no afectó los niveles séricos de ALT, mientras que las tres dosis de la galleta con harina de frijol disminuyeron la actividad AST comprado con los dos grupos control. Inversamente, ambas galletas incrementaron la actividad sérica de ALP en comparación con el grupo diabético. Se ha reportado que un incremento de 5 veces en ALT, AST y ALP refleja daño hepático (Giannini y col., 2005). Por lo tanto el tratamiento con ambas galletas no reflejó un efecto benéfico ni perjudicial sobre el daño hepático inducido por diabetes.

7 CONCLUSIONES

La administración de 0.4 y 0.6 g/día de la galleta con harina de frijol disminuyó ligeramente los niveles séricos de glucosa en ratas diabéticas, lo cual se asocia a un incremento significativo en la producción y/o secreción de insulina, así como a una disminución en la adsorción intestinal de glucosa.

Los tratamientos con la dosis intermedia y alta de la galleta con harina de frijol (0.4 y 0.6 g/día) disminuyeron significativamente el riesgo cardiovascular, presentando un mayor efecto que la galleta comercial.

Con respecto al daño hepático, no se observó ningún efecto benéfico o dañino con la administración de la galleta con harina de frijol.

La galleta con harina de frijol presentó alto contenido de rutina, ácido protocatecuico, ácido cafeico, β -sitosterol, y soyasaponinas, lo que podría estar asociado a sus efectos benéficos.

Estos resultados sugieren que la harina de frijol puede emplearse como ingrediente funcional en la elaboración de productos nutracéuticos con efectos antidiabéticos.

8 REFERENCIAS

ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2004**;27:5-10.

Adams SM, Standridge JB. What should we eat? Evidence from observational studies. *Southern Medical Journal* **2006**;99:744-748.

Allison DB, Paultre F, Maggio C, Mezzitis N, Pi-Sunyer FX. The use of areas under curves in diabetes research. *Diabetes Care* **1995**;18:245-250.

Belobrajdic DP, Bird A. The potential role of phytochemicals in whole grain cereals for the prevention of type-2 diabetes. *Nutrition Journal* **2013**;12:1-12.

Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, Rossi M, Giardini A, Spagnoletti P, *et al.* Mesoamerican origin of common vean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **2011**;788-796.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediator of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of Clinical Investigation* **2004**;114:147-152.

Cámara CR, Urrea CA, Schlegel V. Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agriculture* **2013**;3:90-111.

Chávez RA, Gutiérrez JA, Serna SO. Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant Food for Human Nutrition* **2013**;68:416-423.

Chávez RA, Tovar AR, Serna SO, Torres N, Gutiérrez JA. Conjugated and free sterols from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. *Genes and Nutrition* **2014**;9:367.

Chen CY, Milbury PE, Kwaka HK, Collins FW, Samuel P, Blumberg JB. Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *The Journal of Nutrition* **2004**;134:1459-1466.

Cicero AF, Colletti A. Combinations of phytomedicines with different lipids lowering activity for dislipidemia management: the available clinical data. *Phytomedicine* **2015**;15:S0944-7113

Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JRB, *et al.* Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *American Diabetes Association* **2006**;55:2159-2170.

Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics* **2012**;30:49-59.

Espinosa LG, Lygin A, Widholm JM, Valverde ME, Paredes O. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**;54:4436-4444.

Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2015**;24:283-307.

EUFIC. European Food Information Council. Functional foods [serie en internet] **2006** [consultado 01 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/en/nutrition/functional-foods/expid/basics-functional-foods/>.

FDA. Food and Drug Administration. Food labeling; health claim; phytosterols and risk of coronary heart disease; proposed rule. *Federal Register* **2010**;75:76526-76571.

FID. Federación Internacional de Diabetes. **2013**.

Gallegos JA, Rocha NE, González RF, Ochoa LA, Corzo N, Bello LA, *et al.* Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* **2010**;119:1544-1549.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Journal of the American Heart Association* **2012**;107:1058-1070.

Giannini EG, Testa R, Vincenzo S. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal* **2005**;172:367-379.

Gil LE, Sil MJ, Domínguez ER, Torres LP, Medina JH. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **2013**;51:104-119.

Grajales EM, Osorio P, Goñi I, Hervert D, Guzmán SH, Bello LA. Chemical composition, starch digestibility and antioxidant capacity of tortilla made with a blend of quality protein maize and black bean. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**;13:286-301.

Guajardo M, García D, Serna JA, Gutiérrez SO, Serna S. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry* **2012**;134:1312-1319.

Gupta R, Sharma AK, Dobhal MP, Sharma MC, Gupta RS. Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of Diabetes* **2011**;3:29-37

Halima NB, Saad RB, Khemakhem B, Fendri I, Abdelkafi S. Oat (*Avena sativa* L.): oil and nutriment compounds valorization for potential use in industrial applications. *Journal of Oleo Science* **2015**;64:915-932.

Hassan F, Ismail A, Abdulhamid A, Azlan A. Identification and quantifications of phenolic compounds in bambangan (*Mangifera pajang* Kort) peles and their free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**;59:9102-9111.

Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chemistry* **2006**;99:464-469.

Helmstädter A. Beans and diabetes: *Phaseolus vulgaris* preparations as antihyperglycemic agents. *Journal of Medicinal Food* **2010**;13:251-254.

Hernández D, Mendoza M, Hernandez HL, Guzmán HS, Loarca GF, Salgado LM, *et al.* Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition* **2013**;68:207-212.

Hiai S, Oura H, Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Médica* **1976**;29:116-122.

Hnatuszko K, Kowalczyk T, Gerszberg A, Wiktorek-Smagur A, Kononowicz AK. *Phaseolus vulgaris* – Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances* **2014**;32:1205-1215.

Hsu, FL, Chen, YC, Cheng, JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Médica* **2000**;66:228-230.

Hwang SL, Kim HN, Jung HH, Kim JE, Choi DK, Hur JM, *et al.* Beneficial effects of beta-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**;377:1253-1258.

Islas S, Revilla, MC. Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación. 3a edición. México: Editorial McGrawHill, **2005**:3-20.

Jesch ED, Carr TP. Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research* **2006**;26:579-584.

Jin S, Chang C, Zhang L, Liu Y, Huang X, Chen Z. Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db mice. *PloS One* **2015**;10.

Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2003**;78:728-733.

Kamalakkannan N, Prince PSM. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2006**;293:211-219.

Liu Y, Xiong X, Tang G. Hyperglycemia lowering effect of total saponins from three-soybean liquid. *Chongqing Medical Journal* **2006**.

Liu WH, Lin CC, Wang ZH, Mong MC, Yin MC. Effects of protocatechuic acid on trans fat induced hepatic steatosis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**;58:10247-10252.

Lomas CL, Pérez IF, Caballero J, Guevara RG, Guevara L, Loarca G, *et al.* Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2015**;26:761-768.

Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Tamaya K, Miyata Y, *et al.* α -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**;55:99-105.

McGeoch SC, Johnstone AM, Lobley GE, Adamson J, Hickson K, Holtrop K, *et al.* A randomized crossover study to assess the effect of an oat-rich diet on glycaemic control, plasma lipids and postprandial glycaemia, inflammation and oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* **2014**;30:1314-1323.

Medievilla JJ. Diabetes tipo 2. Comisión de formación continuada. Sistema Nacional de Salud Burgos, España **2010**.

Menéndez E, Lafita FJ, Artola S, Núñez J, Millán AA, Puig DM, *et al.* Recommendations for the pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Endocrinología y Nutrición*. **2011**;58:112-120.

Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* **2009**;5:150-159.

Nathan DM. Diabetes: Advances in diagnosis and treatment. *The Journal American Medical Association* **2015**;314:1052-1062.

NCEP. National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *The Journal of the American Medical Association* **2001**;285:2486-2497.

Nina T. Nutritional information about pinto beans. [Serie en internet] **2012** [Consultado 2015 septiembre 24]. Disponible en: <http://www.livestrong.com/article/311864-calories-in-cooked-pinto-beans/>.

Ocho-Anin AL, Brou KD, Kouakou TH, Kouadio YJ, Gnakri D. Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Medicinal Plants Research Paper* **2010**;4:1757-1761.

Oishi Y, Sakamoto T, Udagawa H, Taniguchi H, Kobayashi-Hattori K, Ozawa Y, *et al.* Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica*

charantia saponin fraction. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**;71:735-740.

Ong KW, Hsu A, Tan BKH. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS One* **2012**;7(3):e32718.

Pitsavos C, Demosthenes B, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, Stefanadis C. Adherence to the mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. *Journal of the American College of Cardiology*. **2004**;82:694-9.

Ramírez AK. Elaboración y evaluación del valor nutricional, nutracéutico y sensorial de una barra horneada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y avena (*Avena sativa*). Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Tesis de maestría **2010**;9-10.

Ramírez AK, Reynoso R, Tejero ME, León F, Loarca G. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International* **2015**;76:92-104.

Ren GY, Chen CY, Chen GC, Chen WG, Pan A, Pan CW, *et al.* Effect of flaxseed intervention on inflammatory marker C-reactive protein: a systematic review and meta analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* **2016**;8:136.

Reusch JE. Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?. *The Journal of Clinical Investigation* **2003**;112:986-988.

Rubio JC. Evaluación antidiabética de tortillas de harina de maíz (*Zea mays* L.) preparadas con diferentes procesos tecnológicos. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Tesis de licenciatura **2012**; 3.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Informe. **2008**.

Salas J, Martínez MA, Bullo M, Ros E. The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2011**;21:B32-B34.

Scazzocchio B, Vari R, Filesì C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C, *et al* Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by

upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. *Diabetes* **2011**;60:2234-2244.

Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology* **2006**;290:G583-G589.

SE. Secretaría de Economía. Dirección General de Industrias Básicas. Análisis de la cadena de valor de frijol. **2012**.

Shyangdan D, Clar C, Ghouri N, Henderson R, Gurung T, Preiss D, *et al.* Insulin sensitizers in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Health Technology Assessment* **2011**;15.

Singleton V, Orthofer R, Lamuela R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology* **1999**;299:152-178.

Sutivisedsak N, Cheng HN, Willett JL, Lesch WC, Tangsrud RR, Biswas A. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Food Research International* **2010**;43:516-519.

Thies F, Masson LF, Boffetta P, Kris P. Oats and CVD risk markers: a systematic literature review. *British Journal of Nutrition* **2014**;112:S19-S30.

Tousch D, Lajoix AD, Hosy E, Azay-Milhau J, Ferrare K, Jahannault C, *et al.* Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. *Biochemicals and Biophysical Research Communications* **2008**;377:131-135.

Vázquez MA, Bettaieb A, Rodríguez C, Soto VC, Perdicaro DJ, Galmarini CR, *et al.* Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Nutrition and Food Research* **2015**;59:622-633.

Wan CW, Wong CN, Pin WK, Wong MH, Kwok CY, Chan RY, *et al.* Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research* **2013**;27:545-551.

Wu CH, Lin MC, Wang HC, Yang MY, Jou MJ, Wang CJ. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. *Journal of Food Science* **2011**;76:T65-72.

Wueest S, Item F, Lucchini FC, Challa TD, Müller W, Blüher M, *et al.* Mesenteric fat lipolysis mediates obesity-associated hepatic steatosis and insulin resistance. *American Diabetes Association* **2015**;17:1-34.

Zhang QQ, Lu LG. Nonalcoholic fatty liver disease: dyslipidemia, risk for cardiovascular complications, and treatment strategy. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* **2015**;3:78-84.