



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL Y SU
EFECTO EN UNA LÍNEA CELULAR DE ADIPOCITOS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LUZALLIE JASSO MATA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
ADRIÁN OCHOA LEYVA, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. JUNIO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAPIIT IN219817 Análisis de valor nutrimental, capacidad antioxidante, fibra dietética y fracciones de hidratos de carbono de diferentes variedades de frijol consumidas en el centro de México.

CONACYT. Beca para estudios de Maestría del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM Sede. Facultad de Química.

ÍNDICE

Índice de figuras	5
Índice de tablas	5
Abreviaturas	7
1 RESUMEN	8
2 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	10
3 MARCO TEÓRICO	12
3.1 La Obesidad, un problema mundial	12
3.2 La Obesidad en México	14
3.3 La Obesidad como un estado de inflamación	16
3.4 Tejido Adiposo	17
3.5 Células 3T3-L1 como modelo <i>in vitro</i> de obesidad	18
3.6 Lipopolisacárido	19
3.7 Polifenoles	20
3.7.1 Clasificación	21
3.7.2 Los polifenoles como tratamiento contra la obesidad	22
3.8 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	23
3.8.1 Producción y residuos derivados del frijol	23
3.8.2 Compuestos flavonoides y no flavonoides de la testa del frijol	23
4 JUSTIFICACIÓN	26
5 HIPÓTESIS	27
6 OBJETIVOS	27
7 METODOLOGÍA	28
7.1 Diagrama general	28
7.2 Métodos y reactivos	28
7.2.1 Reactivos	28
7.2.2 Métodos	29

7.2.2.1 Obtención del extracto polifenólico	29
7.2.2.2 Caracterización de compuestos fenólicos	29
7.2.2.3 Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1	32
7.2.2.4 Ensayos de viabilidad celular	32
7.2.2.5 Análisis estadístico.	32
8 RESULTADOS	34
8.1 Caracterización de compuestos fenólicos	34
8.1.2 Ensayos cualitativos	34
8.1.3 Ensayos cuantitativos	38
8.2 Cultivo celular 3T3-L1	39
8.2.1 Ensayos de viabilidad celular	40
9 DISCUSIÓN	43
10 CONCLUSIONES	46
11 PERSPECTIVAS	46
12 REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obesidad en el mundo. a) Presencia de obesidad en mujeres alrededor del mundo
b) Presencia de obesidad en hombres alrededor del mundo. Fuente: World Obesity, 2016.

Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres y hombres mexicanos en el periodo 1988 a 2016. Fuente: ENSANUT, 2016.

Figura 3. Porcentaje de consumidores de grupos alimenticios recomendables y no recomendables para consumo cotidiano, por grupo de edad. Fuente: Gaona-Pineda, 2018

Figura 4. Contribución energética de grupos de alimentos en la población mexicana, y recomendación por grupo de edad. Fuente: ENSANUT, 2016

Figura 5. Imagen modificada de Macdougald, O. A (2014) .Histología de tejido adiposo tinción con Eosina-Hematoxilina (HE). A) Tejido adiposo marrón y B)Tejido adiposo blanco.

Figura 6. Esquema cronológico de la diferenciación de fibroblasto a adipocito de la línea celular 3T3-L1. Esquema traducido y modificado de Chang & Young Kim, 2019.

Figura 7. Esquema de la organización membranas de las bacterias Gram negativas. Esquema traducido y modificado de Maldonado F., et al., 2016.

Figura 8. Estructuras de los polifenoles. Ácidos hidroxibenzóicos (Hba), ácidos hidroxicinámicos (Hca), flavonoides (F), chalconas (C), estilbenos (S) y lignanos (L). Imagen modificada de Bellitz, 2009.

Figura 9. Estructuras de los flavonoides. Flavanoles (Faol), antocianidinas (Acn), flavanonas (Faon), flavonas (Fon), flavonoles (Fool) e isoflavonas (Ifon). Imagen modificada de Bellitz, 2009.

Figura 10. Diagrama general del proyecto.

Figura 11. Reducción del MTT a Formazan. Imagen diseñada en BioRender.

Figura 12. Prueba de espuma para presencia de saponinas en las variedades Negro Albicampo y Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso.

Figura 13 Método de Biuret para presencia de proteínas. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso

Figura 14. Prueba de Molish para presencia de glucósidos por la. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso

Figura 15. Método de Mayer para presencia de alcaloides por el A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso

Figura 16. Método de Mayer para presencia de alcaloides por el. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso

Figura 17. Determinaciones cuantitativas A) Fenoles totales (mg de ácido gálico/100g de muestra), B) flavonoides totales (mg de quercetina/100g de muestra), C) taninos totales (mg de ácido tánico/100g de muestra) y D) capacidad antioxidante DPPH (% de atrapamiento).

Figura 18. Crecimiento de la línea celular 3T3-L1. A) Día 10 de crecimiento de línea celular B) Día 2 de ser expuestas al kit de diferenciación C) Día 9 después de la diferenciación y mantenerlas con insulina D) Día 9 observadas con un mayor acercamiento poder apreciar las gotas de grasa. Fotografías tomadas en la Unidad de Investigación de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Figura 19. Ensayos de viabilidad celular por MTT y azul de tripano. A) MTT: Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos durante la diferenciación y expuestas a LPS por 24h, B) MTT. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos post-diferenciación y expuestas a LPS por 24h, C) Azul de tripano: Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos durante la diferenciación y expuestas a LPS por 24h y D) Azul de tripano. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos post-diferenciación y expuestas a LPS por 24h. DD: durante diferenciación, PD: post-diferenciación. Diferencia significativa con una $p < 0.05$.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de peso de acuerdo con la OMS considerando el IMC. Fuente: OMS, 2016

ABREVIATURAS

ACD Anemia crónica

C/EBP Proteínas de unión al potenciador de CCAA

DEX Dexametasona

DMEM Dulbecco's Eagle's Medium Modificado

DMSO Dimetil sulfóxido

DMT2 Diabetes Mellitus tipo 2

DPPH 2,2-difenil-1-picrihidrazil

ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FJ Flor de Junio

IBMX 3-isobutil-1-metilxantina

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de Masa Corporal

INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

INSP Instituto Nacional de Salud Pública

LPS Lipopolisacárido

MTT Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NA Negro Albicampo

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OMS Organización Mundial de la Salud

PNS Penicilina-estreptomicina

PPAR γ Receptor activado proliferador de peroxisomas

SFB Suero Fetal Bovino

SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

1 RESUMEN

La obesidad es un problema de salud que a lo largo de los últimos 50 años se ha convertido en una pandemia trayendo consigo el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), problemas cardiovasculares, hígado graso y cáncer contribuyendo a una reducción de la esperanza de vida y un aumento en los gastos del Sector Salud. Aunado a este problema, se ha visto en aumento el consumo de suplementos alimenticios en el mercado, con el fin de contrarrestar los efectos causados por la obesidad.

Muchos de estos suplementos tienen compuestos con efecto antioxidante, entre ellos están los polifenoles, vitamina D, vitamina C, tocoferoles, etc. Estos compuestos disminuyen el estrés oxidante y la inflamación provocada en el tejido adiposo por una hipertrofia (aumento de tamaño) e hiperplasia (aumento de número) de adipocitos, principales reservas de grasa en el cuerpo que se ven afectadas en un estado de obesidad. En México, uno de los principales alimentos que se producen es el frijol *Phaseolus vulgaris*, que en su distribución y venta, genera residuos derivados de las testa (cáscara del frijol), donde se encuentran primordialmente los antioxidantes en la semilla.

En este proyecto se evaluaron dos extractos polifenólicos, derivados de dos variedades de frijol: Negro Albicampo (NA) y Flor de Junio (FJ), en un modelo *in vitro* de células 3T3-L1 expuestas a lipopolisacárido (LPS) como el estimulante del proceso inflamatorio.

Cualitativamente se observó la presencia de azúcares en ambos extractos, siendo el extracto de NA el que presentó una mayor cantidad de azúcares.

Cuantitativamente se determinaron las concentraciones de fenoles y taninos totales. Los extractos derivados de NA en comparación con el extracto de **FJ**, muestran una mayor cantidad de mg equivalentes de ácido gálico y tánico, 84.01 (**67.80**) mg/100 g de muestra y 73.10 (**57.48**) mg/100 g de muestra, respectivamente. En el ensayo de flavonoides totales, ambos extractos presentaron valores de mg equivalentes de quercetina similares: 33.43 mg/100 g muestra NA y 33.98 mg/100 g muestra FJ. En la determinación de la capacidad antioxidante con 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) se obtuvo

un 51.93% de atrapamiento del radical utilizando el extracto de NA y 30.62% con el extracto FJ.

Se realizaron ensayos de viabilidad celular en células 3T3-L1 con la adición de 1000 ng de LPS / mL de medio, seleccionando tres concentraciones a utilizar de ambos extractos: 10, 80 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos muestran que el uso de estos extractos polifenólicos aumentan la viabilidad celular, aún después de ser sometidos a una condición de estrés con el LPS.

2 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El aumento en el consumo de alimentos procesados que en general son altos en sodio, grasas y azúcares ha contribuido en los últimos años al desarrollo de trastornos que forman parte del llamado “Síndrome Metabólico”. Tomando como referencia lo descrito por el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III)*, este síndrome abarca diferentes condiciones como hipertensión, colesterol y triglicéridos en sangre elevados, y alteración en el metabolismo de glucosa, además de una condición de obesidad que disminuye la expectativa de vida¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta un aumento en la de obesidad en los últimos diez años en aproximadamente el 35% de la población mundial². Este aumento está relacionado directamente con el consumo de alimentos procesados que, acompañados de un estilo de vida sedentario, promueven un aumento de peso significativo^{3,4}.

La obesidad es una condición en la cual hay una sobre acumulación de tejido adiposo en las zonas subcutáneas y abdominales del individuo. Durante esta acumulación, el tejido adiposo comienza a tener un papel fundamental en ciertos procesos patológicos y fisiológicos produciendo y liberando adipocinas y citocinas inflamatorias, además de provocar un estado de estrés oxidante dañino para las células causando su muerte⁵.

Investigaciones anteriores, han demostrado el uso de compuestos polifenólicos como tratamientos para reducir los efectos negativos causados en una condición de obesidad. Por ejemplo, las hojas de té verde han sido de los alimentos más estudiados por la cantidad de polifenoles y beneficios a la salud que se les atribuyen^{6,7}. Dentro de estos estudios se ha observado la acción de los polifenoles (3-galato de epigallocatequina) contra la acumulación de tejido adiposo y la reducción en la expresión de genes adipogénicos. De igual forma, Park et. al. en 2019 estudió el efecto de un concentrado de 12 hierbas medicinales provenientes de Asia en un modelo *in vitro* de células fibroblásticas de pre-adipocitos (3T3-L1), observando una inhibición en la formación de las gotículas de grasa⁸.

En este proyecto, se estudiaron los efectos de dos extractos polifenólicos derivados de la testa del frijol (capa externa de la leguminosa) en un modelo celular de adipocitos, células 3T3-L1 expuestas a LPS.

El frijol es una leguminosa tradicional de la dieta mexicana cuyo consumo ha disminuido significativamente. Debido a su aporte nutrimental, resulta importante revalorizarlo, por lo que diversos grupos nacionales se han dedicado a su estudio. Por ejemplo, en trabajos realizados en el grupo del laboratorio 312 de la Facultad de Química, UNAM: la M. en C. Irma Hernández^{9, 10} probó una dieta con frijol negro entero cocido, y un concentrado de proteína de frijol negro variedad Bola Zacatecas sobre un modelo de obesidad inducido por dieta, los resultados obtenidos mostraron respuestas metabólicas y de la microbiota intestinal favorables. De igual manera, Jasso en 2019¹¹, determinó la concentración de fenoles y flavonoides totales de nuevas variedades de frijol generadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Entre estos resultados, se observó que las variedades Negro Albicampo y Flor de Mayo M-38 mostraron contenidos superiores de polifenoles a otras variedades estudiadas (2.92 mg eq. de ác. gálico /g de muestra y 2.19 mg eq. de quercetina/g de muestra para el Negro Albicampo y 2.23 y 2.51 respectivamente para Flor de Mayo M-38).

Otro trabajo de relevante importancia que se realizó en la Universidad del Estado de México, fue la encapsulación de un extracto de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante secado por aspersión, observando las mejores condiciones de encapsulación, temperatura de almacenamiento y estabilidad de los compuestos polifenólicos¹².

Debido a la disponibilidad de las semillas se eligieron las variedades Negro Albicampo, y Flor de Junio para este proyecto.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 La Obesidad, un problema mundial

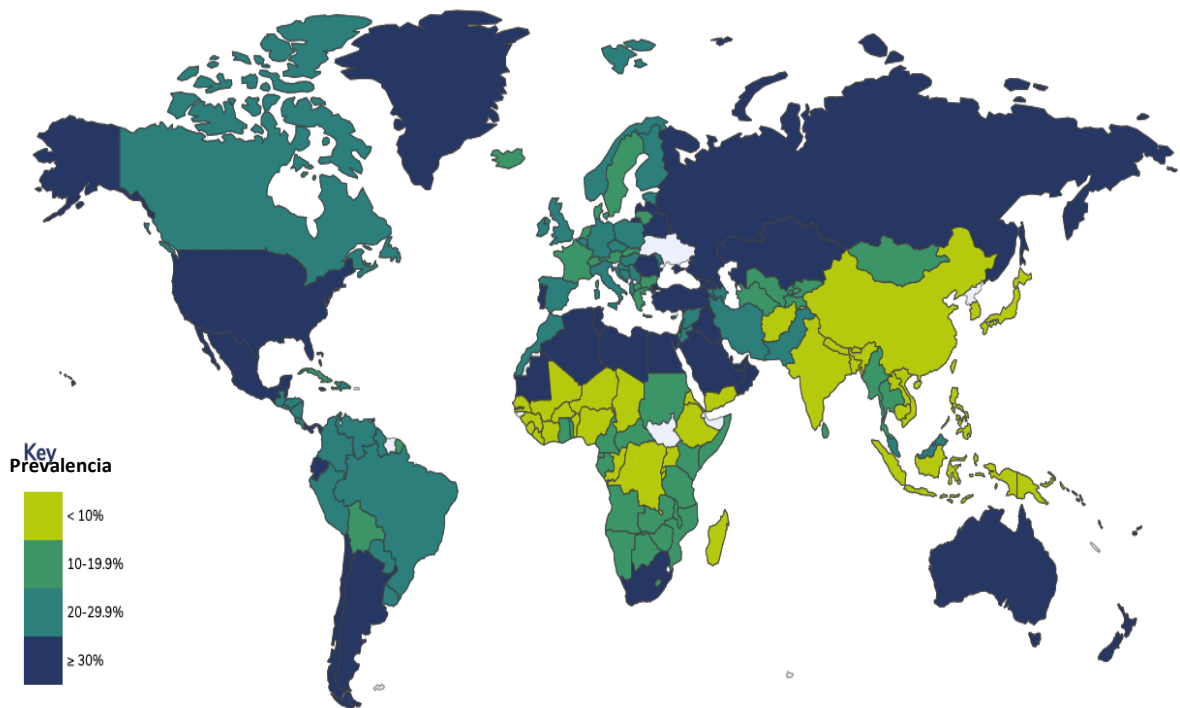
La OMS define a la obesidad y el sobrepeso como “la acumulación anormal de grasa que puede presentar un riesgo a la salud” y se diferencia mediante el índice de masa corporal (IMC) del individuo. El IMC involucra el peso (kilogramos) dividido sobre el cuadrado de la altura (metros), considerando a una persona con obesa con un IMC > 30 kg/m² (Tabla 1). De acuerdo con datos mostrados por la OMS en 2016¹³, se considera esta condición como uno de los más importantes problemas que enfrenta el sector salud actualmente.

Tabla 1. Clasificación de peso de acuerdo a la OMS considerando el IMC. Fuente: OMS,2016

Categoría	IMC (kg/m ²)
Peso bajo	<18.2
Peso Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad I	30-34.9
Obesidad II	35-39.9
Obesidad III	>40

La obesidad es consecuencia de desbalance entre la energía consumida y la energía gastada, este desbalance puede ser causado por cuestiones genéticas (10-30 %), u otros factores ambientales, sociales, psicológicos, entre otros. De acuerdo con estadísticas del 2016, podemos observar en la Figura 1, la presencia de obesidad en las distintas regiones del mundo y su prevalencia en mujeres y hombres.

a)



b)

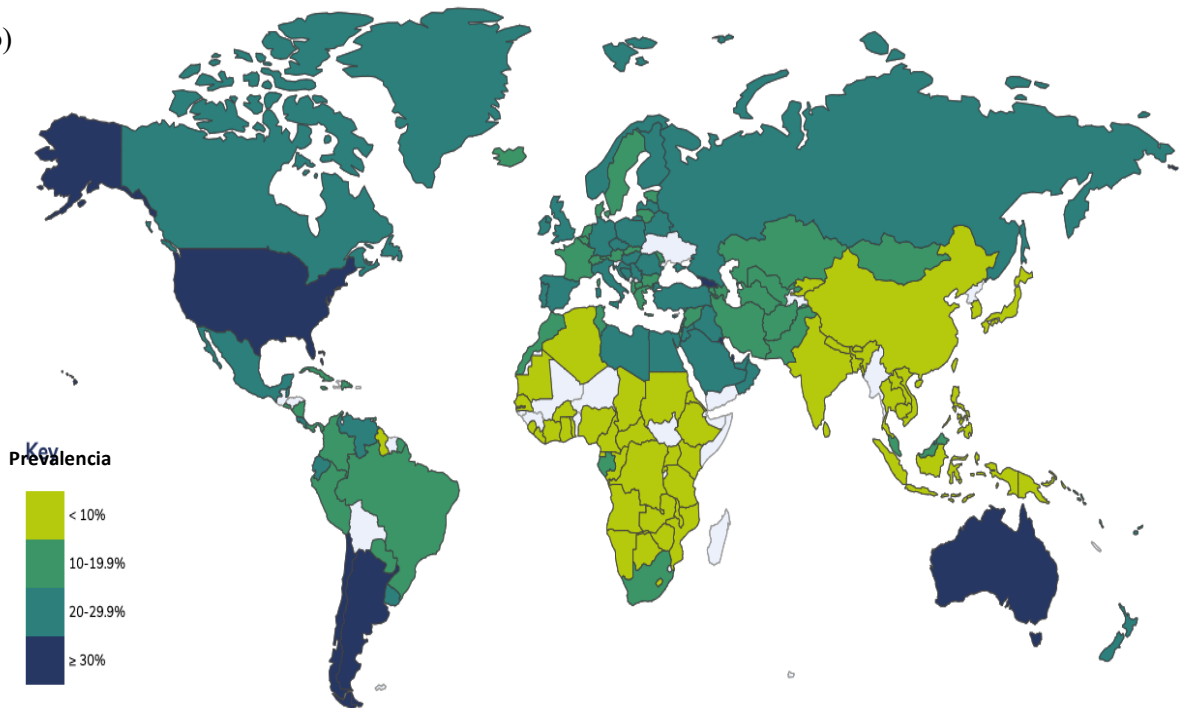
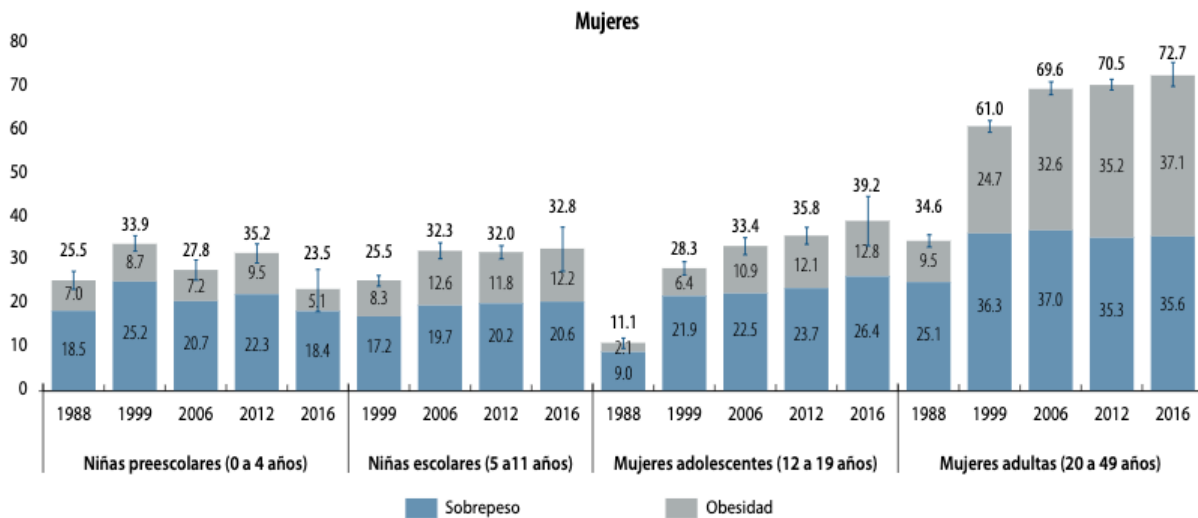


Figura 1. Obesidad en el mundo. a) Presencia de obesidad en mujeres alrededor del mundo b) Presencia de obesidad en hombres alrededor del mundo. Fuente: World Obesity, 2016¹⁴

En la mayoría de los países, el sector poblacional femenino tiende a presentar un mayor riesgo por factores genéticos asociados. Otro factor importante es la educación y el nivel socioeconómico, los cuales han demostrado que, dependiendo del ingreso económico, la población tiende a mantener una dieta más o menos saludable¹⁵.

3.2 La Obesidad en México.

México se encuentra en un estado de emergencia desde el 2000 por el alarmante aumento de obesidad y diabetes en el país. Alrededor de 72.5% de los adultos presentan obesidad y sobrepeso, mayormente en mujeres de edad reproductiva ([Figura 2](#)) y residentes de zonas rurales. Se calcula que los gastos atribuibles en el Sector Salud para tratar enfermedades derivadas de la obesidad se estiman en 151, 894 millones de pesos¹⁶, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) publicados en 2016.



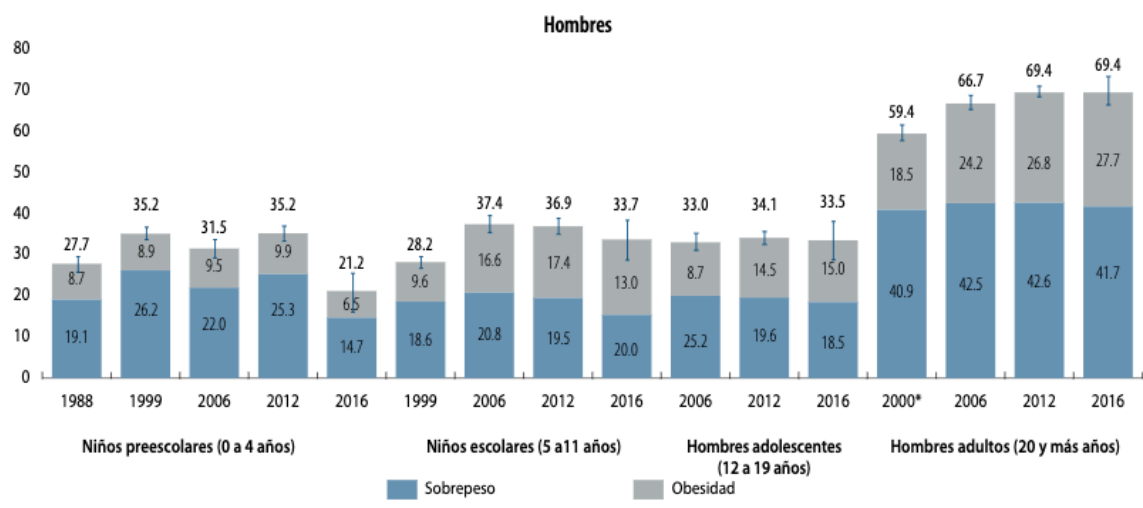


Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres y hombres mexicanos en el periodo 1988 a 2016. Fuente: ENSANUT, 2016.

¿A qué se debe este aumento? La dieta mexicana ha sufrido cambios importantes. El consumo de verduras, leguminosas y frutas ha disminuido. Por otra parte, se ha elevado el consumo de alimentos con alta densidad energética, procesados o ultra procesados con una elevada cantidad de azúcares, grasas, sodio y una baja cantidad de fibra, como muestran los datos presentados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2016 y la recopilación mostrada por el grupo de trabajo de Gaona-Pineda et. al., 2018¹⁷ que se muestran en las Figuras 3 y 4.

Grupo de alimento	Preescolares* % (IC95%)	Escolares† % (IC95%)	Adolescentes‡ % (IC95%)	Adultos§ % (IC95%)
Grupos de alimentos recomendables para consumo cotidiano				
Frutas	43.4 (39.0-47.9)	45.7 (42.0-49.5)	39.2 (36.0-42.4)	51.4 (49.3-58.5)
Verduras	18.5 (15.1-22.4)	22.6 (19.3-25.9)	26.9 (23.8-30.2)	42.3 (40.2-44.4)
Leguminosas	54.3 (50.2-58.3)	60.7 (56.4-64.9)	63.1 (59.5-66.5)	70.0 (67.5-72.4)
Carnes no procesadas	38.2 (33.7-42.9)	40.2 (35.9-44.4)	48.8 (45.4-52.3)	86.7 (85.2-88.0)
Agua	82.4 (79.2-85.3)	85.9 (83.1-88.7)	83.2 (80.6-85.6)	87.3 (85.7-88.7)
Huevo	47.1 (42.6-51.7)	48.8 (44.3-53.2)	46.4 (43.0-49.8)	48.1 (45.7-50.6)
Lácteos	73.8 (69.8-77.4)	66.6 (62.9-70.3)	61.1 (57.7-64.4)	61.7 (59.6-63.7)
Grupos de alimentos no recomendables para consumo cotidiano				
Carnes procesadas	22.3 (18.8-26.3)	22.5 (19.3-25.8)	23.7 (21.1-26.5)	19.8 (18.2-21.6)
Comida rápida y antojitos mexicanos	8.7 (6.2-12.2)	15.6 (12.0-19.2)	21.4 (18.8-24.2)	18.3 (16.6-20.2)
Botanas, dulces y postres	62.5 (58.1-66.7)	61.9 (58.2-65.6)	59.4 (56.1-62.5)	38.0 (35.7-40.3)
Cereales dulces	50.5 (46.2-54.8)	53.4 (49.2-57.6)	50.3 (46.8-53.7)	45.6 (43.5-47.7)
Bebidas no lácteas endulzadas	74.1 (69.6-78.2)	81.5 (78.1-84.8)	83.9 (81.4-86.1)	85.3 (83.8-86.6)
Bebidas lácteas endulzadas	38.2 (33.9-42.6)	40.4 (36.5-44.2)	33.2 (30.2-36.4)	24.1 (22.4-35.8)

Figura 3. Porcentaje de consumidores de grupos alimenticios recomendables y no recomendables para consumo cotidiano, por grupo de edad. Fuente: Gaona-Pineda, 2018

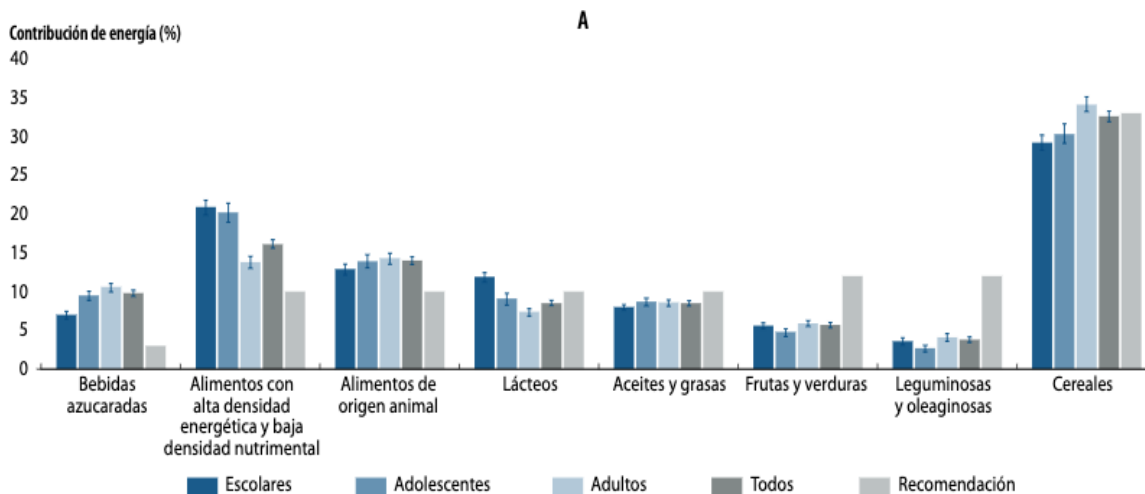


Figura 4. Contribución energética de grupos de alimentos en la población mexicana, y recomendación por grupo de edad. Fuente: ENSANUT, 2016

3.3 La obesidad como un estado de inflamación.

La obesidad es un complejo de desórdenes que trae consigo la presencia de un estado de inflamación crónica de baja intensidad en reacción al aumento de triglicéridos y colesterol en el torrente sanguíneo generando una respuesta protectora en el tejido conectivo vascular a un estímulo perjudicial al organismo. Sin embargo, este estado de inflamación puede llegar a ser perjudicial para el individuo por la desregulación metabólica implicada y la cantidad de moléculas proinflamatorias que recorren el torrente sanguíneo. El exceso de triglicéridos en el tejido adiposo estimula la liberación de mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), además de reducir la producción de moléculas como adiponectina, aumentando el estado proinflamatorio y generando un estrés oxidante¹⁸.

La inflamación se caracteriza principalmente por una permeabilidad vascular para la vasodilatación y la presencia de células inflamatorias como macrófagos y citocinas¹⁹. El tejido adiposo es uno de los principales participantes en esta condición de obesidad, siendo considerado como un tejido de reserva de energía, además de ser generador de estas moléculas proinflamatorias.

3.4 Tejido adiposo

El tejido adiposo es considerado un órgano metabólicamente activo, que funciona principalmente para el almacenamiento de energía y tiene la capacidad de sintetizar una cantidad de compuestos activos para la regulación de la homeostasis metabólica influyendo en procesos biológicos y fisiológicos importantes. Es un órgano heterogéneo formado por diferentes tipos de células: adipocitos maduros, preadipocitos, células endoteliales, granulocitos, linfocitos y macrófagos^{20,,21}.

El tejido adiposo se divide en dos tipos (Figura 5): tejido adiposo pardo y tejido adiposo blanco. El tejido adiposo pardo posee adipocitos multiloculares con una expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), responsable de la actividad termogénica del tejido, encontrándose principalmente en bebés y posteriormente disminuye en la etapa adulta²². El tejido adiposo blanco es el encargado del almacenamiento de la glucosa posprandial en forma de triglicéridos (reserva energética en condiciones de ayuno) y es también un órgano con funciones endocrinas que secreta una cantidad considerable de citocinas y hormonas polipeptídicas, entre ellas la leptina²³.

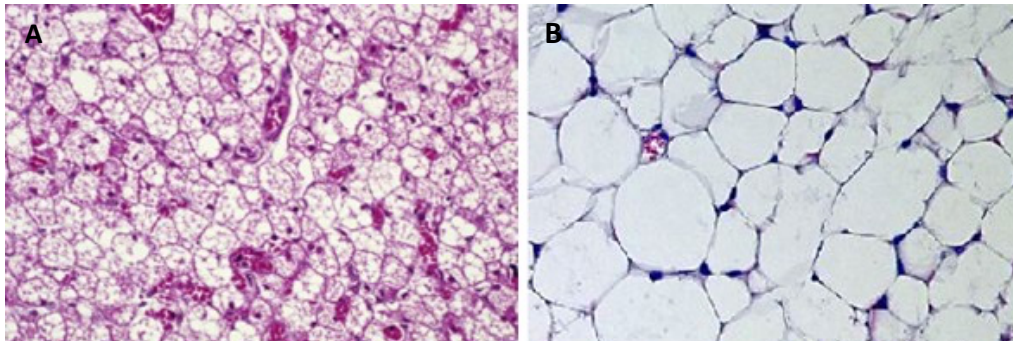


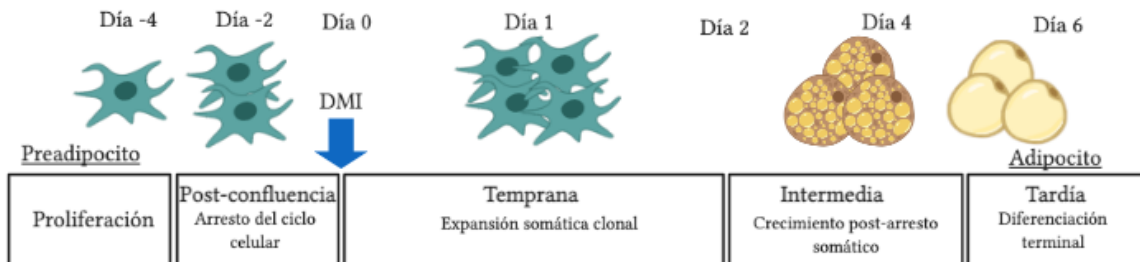
Figura 5. Imagen modificada de Macdougald, O. A (2014)²⁴. Histología de tejido adiposo tinción con Eosina-Hematoxilina (HE). A) Tejido adiposo marrón y B) Tejido adiposo blanco.

En modelos de obesidad, se observa un incremento en la deposición del tejido blanco, así como la hiperplasia (aumento del número) e hipertrofia (aumento del tamaño) de los adipocitos, secretando citocinas que contribuyen a una respuesta inflamatoria

crónica. El modelo *in vitro* más estudiado para obtener información acerca del funcionamiento del tejido adiposo, en específico de los adipocitos, utiliza la línea celular 3T3-L1.

3.5 Células 3T3-L1 como modelo *in vitro* de obesidad.

Los procesos celulares y moleculares de adipogénesis pueden ser estudiados *in vitro* utilizando una línea celular de fibroblastos 3T3-L1, cuya capacidad de diferenciación sigue activa, es decir, que cuentan con la capacidad de acumular grasa ante la exposición de una serie de compuestos. La diferenciación hacia adipocitos involucra el tratamiento con agentes pro-diferenciadores después del arresto de la división celular; comúnmente se utiliza insulina, glucocorticoides sintéticos como dexametasona (DEX) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). Una exposición temprana a estos agentes promueve la regulación positiva de los genes que llevan a un programa adipogénico, incluyendo la familia de factores de transcripción C/EBP y PPAR γ , activando la expresión de genes adipogénicos, incrementando los niveles de glucosa y síntesis de triglicéridos, además de que la célula comienza a presentar signos de acumulación de lípidos aproximadamente en los días tres o cuatro de exposición al medio de diferenciación (Figura 6)^{25,26,27}.



Created in BioRender.com bio

Figura 6. Esquema cronológico de la diferenciación de fibroblasto a adipocito de la línea celular 3T3-L1. Esquema traducido y modificado de Chang & Young Kim, 2019²⁷.

Durante la adipogénesis o post-diferenciación, a las células se les pueden añadir agentes externos para simular el estado de inflamación crónica que se presenta en la obesidad. Entre los compuestos más utilizados se encuentra el lipopolisacárido (LPS)

3.6 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que juega un rol muy importante en la patogénesis. La estructura del compuesto está formada por el lípido A, un oligosacárido central y el antígeno O ([Figura 7](#)).

- *Lípido A*

Localizado en la cara interna de la membrana citoplasmática, el lípido A se compone principalmente de ácidos grasos seguido de un oligosacárido central cuya función es mantener la integridad de la membrana. El lípido A es el principal inmuno-estimulador del LPS y es el responsable de actividades biológicas importantes como la citotoxicidad^{28,29}.

- *Oligosacárido central*

Es un compuesto formado por oligosacáridos que presentan ramificaciones y fosforilaciones. Se encuentra en la región interna de la membrana, proximal al lípido A. Este componente puede variar de bacteria a bacteria³⁰.

- *Antígeno O*

El antígeno O de las bacterias Gram-negativas es un polímero con subunidades repetidas de oligosacáridos con una alta variabilidad antigénica. Se encuentra localizado en la parte más externa del LPS³¹.

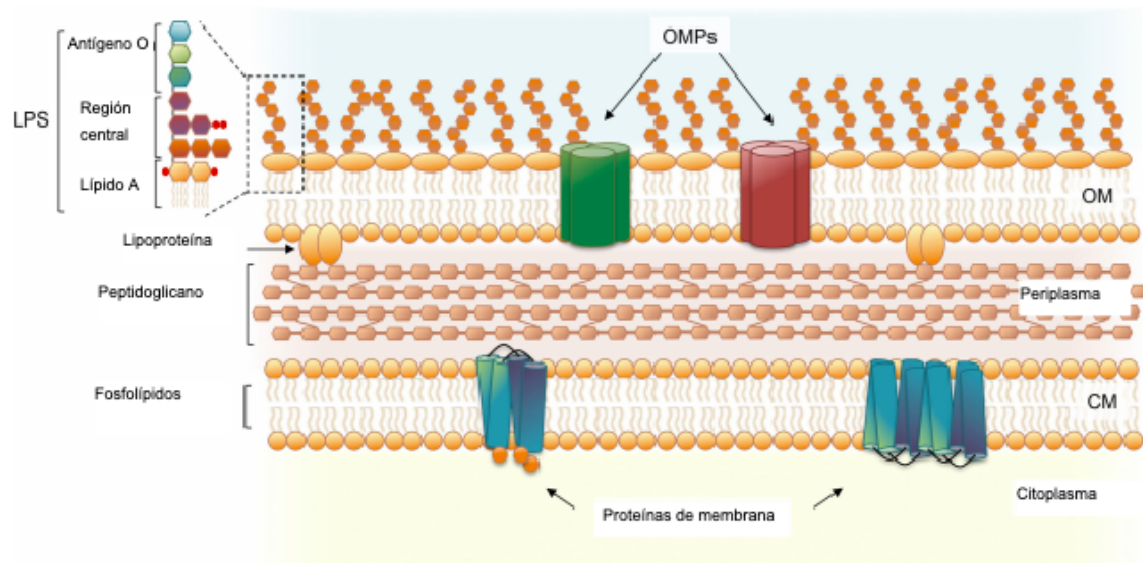


Figura 7. Esquema de la organización membranas de las bacterias Gram negativas. Esquema traducido y modificado de Maldonado F. et al., 2016²⁸. OM: Membrana externa (outer membrane), OMPs: Proteínas de membrana externa (outer-membrane proteins) y CM: membrana citoplásmica (cytoplasmic membrane)

En células 3T3-L1, la adición de LPS al medio induce factores pro-inflamatorios como la activación de la vía de transducción de NF- κ B y el aumento de citocinas pro-inflamatorias que afectan la sensibilidad a insulina³². Entre los compuestos que se han estudiado para aminorar la inflamación y aumentar la viabilidad celular en modelos *in vitro* de adipocitos se encuentran los polifenoles.

3.7 Polifenoles

Entre los compuestos que se han estudiado como posibles tratamientos contra los efectos de la obesidad se encuentran los polifenoles que se encuentran en frutas, vegetales, té verde y algunas leguminosas, presentando una fuerte capacidad antioxidante³³.

El color es una de las referencias principales para saber si un alimento contiene o no polifenoles; la mayoría de estos compuestos presenta coloraciones azules, moradas o rojas que los hacen atractivos a polinizadores, los protegen de los rayos ultravioleta (UV) y sirven de protección contra plagas^{34, 35}.

3.7.1 Clasificación

La familia de los polifenoles abarca una amplia gama de compuestos cuya estructura presenta anillos aromáticos e hidroxilos. Dentro su clasificación, se pueden encontrar moléculas sencillas como los ácidos fenólicos y estilbenos, hasta moléculas de mayor tamaño polimerizadas como los taninos³⁶.

La Figura 8, muestra la clasificación de los polifenoles de acuerdo con su número de enlaces, anillos aromáticos y grupos OH. Dentro de esta clasificación, los flavonoides son los que muestran una mayor variabilidad (Figura 9)³⁷.

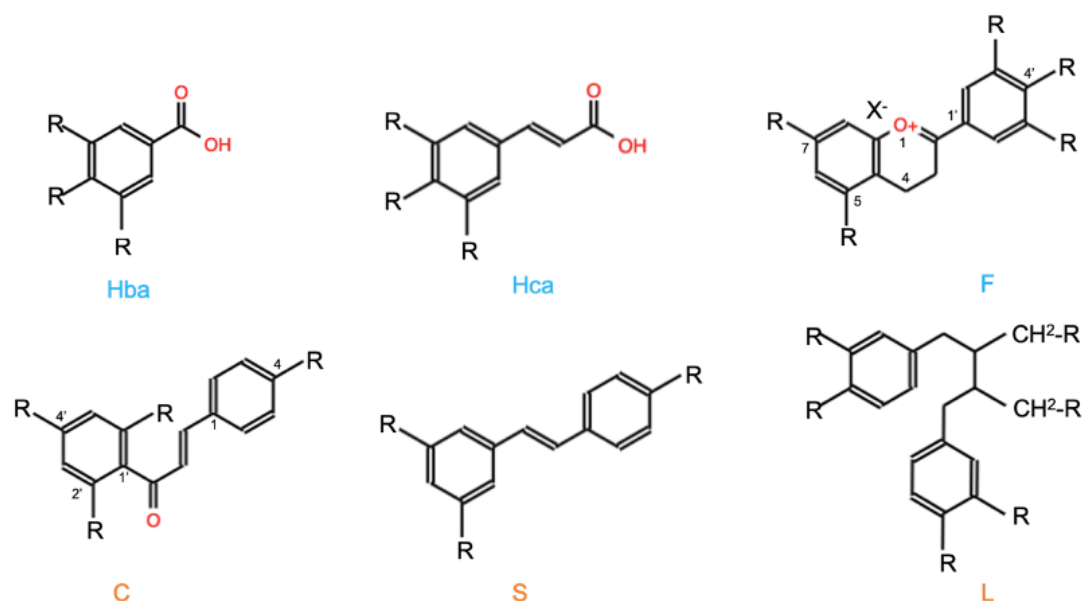


Figura 8. Estructuras de los polifenoles. Ácidos hidroxibenzóicos (Hba), ácidos hidroxicinámicos (Hca), flavonoides (F), chalconas (C), estilbenos (S) y lignanos (L). Imagen modificada de Bellitz, 2009³⁸.

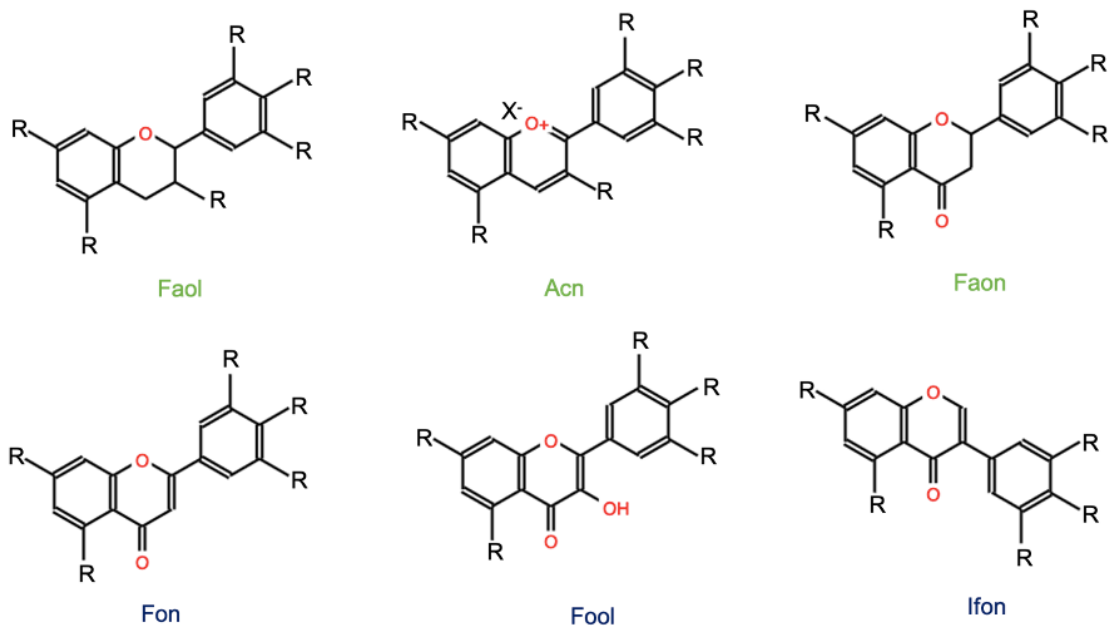


Figura 9. Estructuras de los flavonoides. Flavanoles (Faol), antocianidinas (Acn), flavanonas (Faon), flavonas (Fon), flavonoles (Fool) e isoflavonas (lfon). Imagen modificada de Bellitz, 2009³⁸.

La mayoría de estos compuestos se encuentran glicosilados en la tercera posición del anillo, lo que les confiere una mayor estabilidad en el tracto digestivo durante su consumo. Es importante mencionar que su absorción es reducida, sin embargo, la microbiota intestinal puede metabolizarlos a moléculas absorbibles, así como ácidos fenólicos³⁹ cuyo impacto en la salud resulta benéfico para el individuo.

3.7.2 Los polifenoles como tratamiento contra la obesidad

Como se mencionó anteriormente, la obesidad es un problema de salud que ha ido aumentando en los últimos años. Estudios recientes han mostrado el impacto que tiene el consumo de polifenoles para disminuir los daños causados al organismo.

- Ensayos *in vivo*

En estudios de modelos murinos C56BL/6 expuestos a una dieta alta en grasa, añadiendo una mezcla de compuestos polifenólicos (resveratrol, curcumina, polifenoles derivados de la manzana, entre otros) han mostrado una disminución en el aumento de peso, el porcentaje de grasa y de triglicéridos, promoviendo un mayor gasto energético y

modulando la homeostásis de la glucosa⁴⁰. Además de eso, se han observado cambios en la expresión de genes que codifican enzimas como la sintasa de ácidos grasos, la lipoproteína lipasa y la hormona sensible a lipasa, por mencionar algunos^{41,42}.

- Ensayos *in vitro*

Este tipo de estudios han mostrado que el uso de compuestos fenólicos como galatos de epigallocatequina, resveratrol y curcumina reducen la diferenciación celular de adipocitos, así como la acumulación de triacilglicéridos. En células 3T3-L1, la adición de estos compuestos en el medio de cultivo aumenta la viabilidad celular cuando se induce inflamación vía LPS. Pan et al.⁴² demostró que el uso de un extracto polifenólico derivado de alimentos cítricos y té verde disminuyen los efectos causados por el LPS en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Los resultados mostraron un aumento en la viabilidad celular y disminución en las gotículas de triglicéridos formadas en las células con la adición de este extracto polifenólico, en comparación con aquellas células que no fueron tratadas con el extracto.

De igual manera, el trabajo publicado por Zhu et al.⁴³ muestra que la combinación de dos compuestos polifenólicos (berberina y resveratrol) disminuyen significativamente la acumulación de lípidos en células 3T3-L1, de una manera dosis dependiente. Entre otros compuestos que han sido estudiados para disminuir la adipogénesis y la inflamación en modelos *in vitro* se encuentran: el tirosol (aceite de oliva)⁴⁴, la espirulina⁴⁵, gingerol (jengibre)⁴⁶ y las bayas de sauco⁴⁷, entre otros.

Uno de los alimentos representativos de México que puede ser utilizado por la cantidad de polifenoles que presenta en su testa, es el frijol. Las leguminosas son una fuente importante de proteína en la alimentación, principalmente para la población mexicana, y que en los últimos 30 años ha visto disminuido notablemente su consumo y producción.

3.8 Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

México posee la mayor diversidad del género *Phaseolus*, dentro de los cuales, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es el de mayor importancia agronómica y económica por la extensión de su cultivo dentro de la República Mexicana. Le siguen en importancia otras

variedades de frijol como: el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), el frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) y el frijol lima (*Phaseolus lunatus*). El cultivo de estas variedades se ha visto limitado por los cambios en hábitos de consumo en muchas regiones⁴⁸.

3.8.1 Producción y residuos derivados del frijol.

De acuerdo con datos obtenidos por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)⁴⁹ del 2019 al 2020 las hectáreas cultivadas y cosechadas disminuyeron en un 25.1%, con una producción de 577 mil 492 toneladas en el año 2020 (mes de enero), cifra que representa una pérdida del 31.5% con respecto al mes anterior. Aunado a esto, los residuos generados a partir de la cosecha (frijoles descascarillados o quebrados) representan una pérdida del 5% de la producción total anual, motivo por el cual se quiere estudiar el uso del residuo de la testa del frijol proveniente de los frijoles descascarillados para la obtención de un extracto polifenólico y evaluarlo en un modelo de obesidad *in vitro*.

3.8.2 Compuestos flavonoides y no flavonoides de la testa del frijol.

Los compuestos fenólicos presentes en frijoles incluyen una variedad de flavonoides como: antocianinas, flavonoles, proantocianidinas, taninos, así como una gran cantidad de ácidos fenólicos⁵⁰.

Las proantocianidinas se encuentran en la mayoría de las variedades de frijol, y las antocianinas pueden ser caracterizadas en las variedades de frijol negro^{51,52,53}. La mayoría de estos compuestos fenólicos se encuentran en la testa (parte externa de la leguminosa), mientras que los cotiledones pueden contener trazas^{54,55}. El flavonoide con mayor presencia en el frijol es la quercetina y se encuentra glicosilada en la tercera posición lo que permite formar complejos con iones metálicos⁵⁶, algunas antocianinas presentes en esta leguminosa han demostrado regular enzimas inhibiendo a la alfa amilasa, la maltasa, y la actividad de la sacarasa, disminuyendo la glucosa en sangre postprandial.

Son varios los beneficios que se han encontrado en el consumo de polifenoles, y hoy en día es muy común encontrar suplementos alimenticios con acción antioxidante. Sin embargo, los suplementos probablemente no producen el mismo efecto que si se consume

completo el alimento, por lo que se han estado investigando los procesos que permitan la extracción de estos compuestos y su evaluación como suplemento alimenticio.

Cabe mencionar que los alimentos de los cuales se han extraído estos compuestos ya eran conocidos por su alta capacidad antioxidante y en su mayoría, no son producidos en México. Por esta razón, este proyecto pretende apostar por el uso de un alimento tradicional, con el fin de obtener información y promover el uso de la biodiversidad agrícola.

4 JUSTIFICACIÓN

La información acerca del impacto de la dieta tradicional mexicana en la salud es escasa, por lo que en el grupo de trabajo se ha tratado de revalorizar el consumo de estos alimentos, así como su uso para la generación de productos que puedan ser utilizados por la población. Uno de estos alimentos es el frijol que, como sucede con todos los granos y alimentos frescos, sufre mermas durante su producción y transporte a los centros de distribución, generando una enorme cantidad de residuos. La cifra de merma y desperdicio en la industria agroalimentaria llega a ser tan alta como del 40%⁵⁷.

Para el caso de este proyecto, el embolsado del frijol, cuando se trata de granos almacenados durante largo tiempo, provoca aun mayores pérdidas por la rotura de las semillas. Estos granos ya no son utilizados para el embolsado, pero pueden usarse en la producción de frijoles refritos y frijoles en polvo. O bien, puede utilizarse la testa desprendida de estas mitades para la extracción de polifenoles. En ambos casos, como alimento o como la materia prima para obtener compuestos fenólicos, es valioso generar conocimientos acerca de su potencial antioxidante y su comportamiento en el metabolismo, por lo que se pretende obtener una información más detallada sobre las bondades de su consumo y su posible uso terapéutico.

Ya se ha observado en estudios previos con esta leguminosa^{10,11} que se logra mejorar la respuesta metabólica de animales obesos inducidos por dieta, y también se logra restaurar la microbiota intestinal.

Este proyecto pretende investigar la contribución de extractos polifenólicos derivados de dos variedades de frijol (Negro Albicampo y Flor de Junio) en la modulación de la viabilidad celular de células 3T3-L1 expuestas a LPS, con el fin de observar si hay un comportamiento positivo ante el uso de polifenoles, y generar información base para conocer en qué concentraciones puede utilizarse en un futuro, para evaluar su función en un modelo animal.

5 HIPOTESIS

- El uso de extractos polifenólicos con alta capacidad antioxidante de dos variedades de frijol (Negro Albicampo y Flor de Junio) tendrán un efecto positivo en la viabilidad celular de adipocitos expuestos a LPS.

6 OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto del uso de extractos polifenólicos derivados de dos variedades de frijol (Negro Albicampo y Flor de Junio) en la viabilidad celular durante la diferenciación y post-diferenciación de la línea celular 3T3-L1 expuesta a LPS.

Objetivos particulares

- Conocer la composición química aproximada de los extractos polifenólicos de dos variedades de frijol (Negro Albicampo y Flor de Junio) mediante ensayos cuantitativos, cualitativos y evaluar su capacidad antioxidante.
- Evaluar la viabilidad celular de las células 3T3-L1 expuestas a LPS por 24h utilizando distintas concentraciones de los extractos polifenólicos (10, 80 y 150 ug/ mL) durante y después de la diferenciación celular.

7 METODOLOGÍA

7.1 Diagrama general

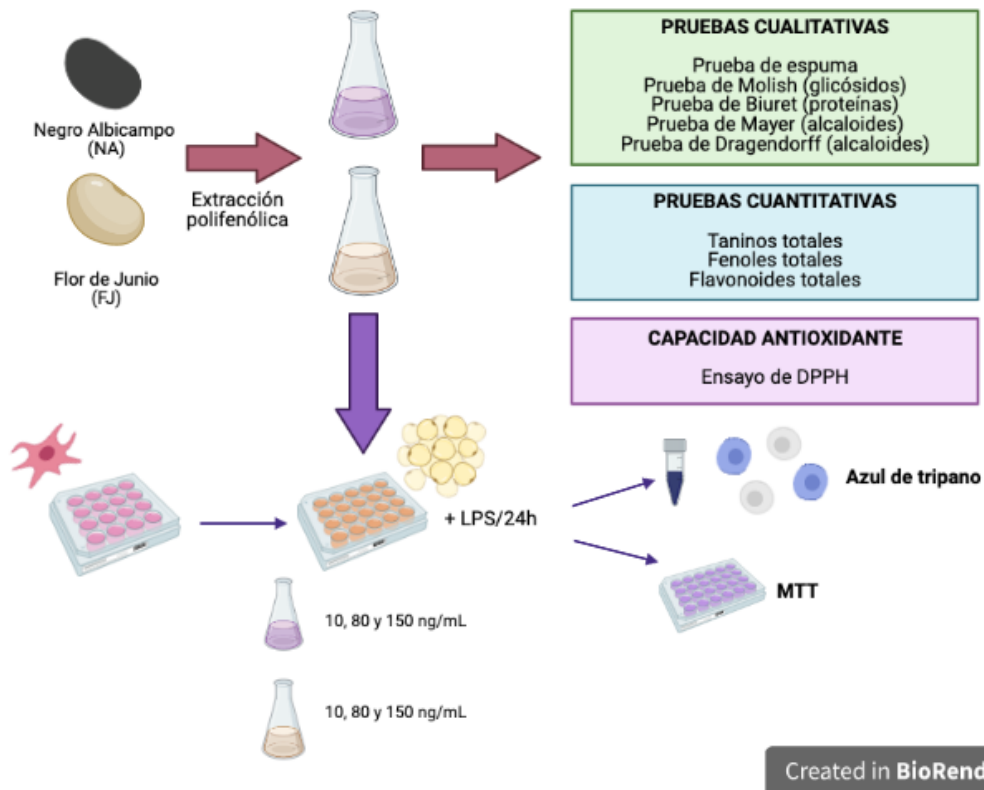


Figura 10. Diagrama general del proyecto.

7.2 Métodos y reactivos

7.2.1 Reactivos

Molisch. Se disuelven 0.5 g de α -naftol en 10 mL de etanol (95%). Se almacena protegido de la luz a temperatura ambiente.

Biuret. Se pesan 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, adicionando 9 g de tartrato de sodio y potasio. Se disuelven en 500 mL de NaOH 0.2 M, añadiendo 5 g de KI y completando el aforo con NaOH a 1000 mL.

Reactivo de Mayer. Se disuelven 1.36 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua en un matraz Erlenmeyer, en otro matraz, se disuelven 5 g de yoduro de potasio, las soluciones se mezclan y se aforan hasta un volumen de 100 mL con agua destilada.

Reactivo de Dragendorff. Se mezclan 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico (30%) con una solución de 27.7 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua destilada. La mezcla se deja reposar 24 h, se decanta y lleva a un aforo de 100 mL con agua destilada.

Butanol-HCl (butanol-HCl 95:5 v/v). Se mezclan 950 mL de n-butanol con 50 mL de HCl concentrado (37%).

Reactivo férrico. Se disuelven 2.0 g de sulfato de amonio férrico en HCl 2N.

7.2.2 Métodos

7.2.2.1 Obtención del extracto polifenólico

Se pesan 100 g de frijol Negro Albicampo y Flor de Junio; se dejan remojar por 16 h. Se retiran las testas manualmente, y se colocan en un deshidratador TSM PRODUCTS Food Dehydrator, a una temperatura de 52°C por alrededor de una hora. Una vez terminado el tiempo de deshidratación, se llevan a molienda y tamizado en malla No. 60. Posteriormente, se pesa una cantidad de muestra y se agrega una solución de etanol: agua: ácido acético (80:14:6), en relación 1:40 (muestra: solución), se colocan en agitación durante 2 h, y se filtran los extractos (por triplicado). Se colocan en recipientes ámbar y se guardan en refrigeración hasta su uso (Nota: no guardar por más de 2 meses).

7.2.2.2 Caracterización de compuestos fenólicos

El método de extracción de polifenoles puede acarrear otros compuestos o metabolitos secundarios que producen las plantas. Entre los compuestos que pueden interactuar con los polifenoles se encuentran las saponinas, alcaloides, proteínas y azúcares.

Prueba de espuma

Se toman 0.2 mL del extracto y se colocan en un tubo de ensayo, posteriormente se agregan 6 mL de agua destilada. Se agita manualmente por dos minutos. Si es positiva la prueba, se formará la espuma, que indica la presencia de terpenos y esteroides⁵⁸.

Prueba de Molish (glicósidos)

En un tubo de ensayo se colocan 0.5 mL del extracto, se añaden 0.5 mL del reactivo de Molish y se calienta en un baño de agua hirviendo por cinco minutos. Finalmente, si la prueba es positiva, se observa la presencia de un anillo color violeta indicando la presencia del azúcar reductor⁵⁹.

Prueba de Biuret (proteínas)

En un tubo de ensayo se agregan 0.5 mL de extracto, y se agregan una o dos gotas del reactivo de Biuret. Si la prueba es positiva, se observa la formación de un precipitado violeta que muestra la presencia de proteínas⁶⁰.

Prueba de Mayer (alcaloides)

En un tubo de ensayo se agregan 0.5 mL de extracto y 0.5 mL de HCl, posteriormente se agrega 0.5 mL del Reactivo de Mayer y se agita manualmente. Si la prueba es positiva, se observa la formación de un precipitado amarillo, mostrando la presencia de alcaloides⁶¹.

Prueba de Dragendorff (alcaloides)

Se añaden 0.5 mL del extracto y 0.5 mL de HCl, posteriormente se agregan 0.5 mL del reactivo de Dragendorff, se agita manualmente. Si la prueba es positiva, se observa la formación de un precipitado amarillo, mostrando la presencia de alcaloides⁶².

Taninos totales

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se colocan 50 µL del extracto, posteriormente se añaden 250 µL del reactivo de Folin (1:1), se mezclan e incuban durante cinco minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente, se agregan 500 µL de Na₂CO₃ (20%), se mezcla e incuba durante 60 min en oscuridad y temperatura ambiente. Para finalizar, se agrega 1 mL de agua destilada, agita y se mide la absorbancia a 725 nm⁶³. Como curva estándar se utiliza ácido tánico puro con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL.

Fenoles totales

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se colocan 50 μL del extracto, posteriormente se añaden 250 μL del reactivo de Folin (1:1), se mezclan e incuban durante cinco minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente, se agregan 500 μL de Na_2CO_3 (20%), se mezcla e incuba durante 60 min en oscuridad y temperatura ambiente. Para finalizar, se agrega 1 mL de agua destilada, se agita y se mide absorbancia a 760 nm⁶⁴. Como curva estándar se utiliza ácido gálico puro con concentraciones entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Flavonoides totales

En un tubo de ensayo se colocan 0.25 mL de extracto, posteriormente se añaden 1.25 mL de agua destilada. A esta misma solución, se agregan 75 μL de NaNO_2 (5%), se deja reposar por seis minutos y después se añaden 150 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (10%), se deja reposar por 5 minutos y se añaden 0.5 mL NaOH (1M). Finalmente se añaden 2.5 mL de agua destilada y se mide absorbancia a 510 nm⁶⁴. Se realiza una curva estándar con quercetina de 0 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- *Capacidad antioxidante*

Ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH

El DPPH es un radical que presenta un color violeta el cual en presencia de un antioxidante se decolora hacia un amarillo pálido. Los resultados indican el porcentaje de atrapamiento del radical o también, la capacidad antioxidante del compuesto a estudiar.

Se coloca 1 mL de la solución 0.1 mM de DPPH en metanol a 3 mL de la solución de extractos en metanol a diferente concentración (50, 100, 200, 400 y 800 μg de extracto/mL de metanol). Se agitan las soluciones y se dejan reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la absorbancia a 517 nm. El resultado se expresa como porcentaje de atrapamiento del radical DPPH⁶⁵.

7.2.2.3 Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1

Se adquirió el cultivo celular de fibroblastos de embriones de ratón 3T3-L1 en ATTC® (CL-123™), los pre-adipocitos se mantuvieron en el medio Dulbecco's Eagle's Modificado (DMEM) (Científica Senna, S.A. de C.V.), el cual contiene 4mM L-glutamina, 4500 mg/L glucosa, 1mM de piruvato de sodio y 1500 mg/L de bicarbonato de sodio, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (AccesoLab), 1% penicilina-estreptomicina (PNS). Para llevar a cabo la diferenciación celular, se utilizó un kit de diferenciación que contiene: insulina (1.5 mg/ml) 0.6 ml (DIF001A), cocktail de diferenciación 1000x (liofilizado) 1 vL (DIF001B) y dimetil sulfóxido (DMSO, anhidro) 0.5 ml (DIF001C) (Sigma Aldrich, DIF001-1KT). La insulina se agrega al medio para inducir la acumulación de lípidos en la célula. El medio se cambia cada dos días hasta que ocurra el máximo de diferenciación (en este proyecto fue en los días 5 o 6 después de colocar el medio de diferenciación).

7.2.2.4 Ensayo de viabilidad celular

Se evaluaron dos tiempos de aplicación de los extractos polifenólicos: durante y posterior a la diferenciación celular, utilizando las concentraciones de extractos de 0, 10, 80 y 150 µg de extracto/mL de DMEM suplementado. A las células tratadas con los extractos durante la diferenciación celular y aquellas que fueron tratadas post-diferenciación, al quinto día fueron expuestas a LPS (1000 ng/mL) durante 24 h. Al día siguiente se evaluó la viabilidad celular utilizando los ensayos de Azul de Tripano y bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Azul de tripano

El ensayo de azul de tripano se basa en el principio de que las células viables mantienen intacta su membrana excluyendo algunos colorantes como el azul de tripano o eosina, por lo que la célula no se teñirá de azul. Al contrario, las células no viables se muestran de un color azul⁶⁶.

En una placa de 96 pozos se colocan 100 µl de la solución de azul de tripano y el sobrenadante celular en relación 1:1, posteriormente se coloca en una cámara de Neubauer o hemocitómetro, para observar en el microscopio y realizar el conteo celular⁶⁶

Ensayo de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

El fundamento del ensayo MTT (Figura 11) se basa en la habilidad de las células viables de convertir la sal MTT en un compuesto insoluble que es el formazán, esta reacción ocurre en el sistema de transporte de electrones dentro de la mitocondria en el cual el NADPH se oxida y el MTT se reduce, esta reacción es catalizada principalmente por la succinato deshidrogenasa⁶⁹.

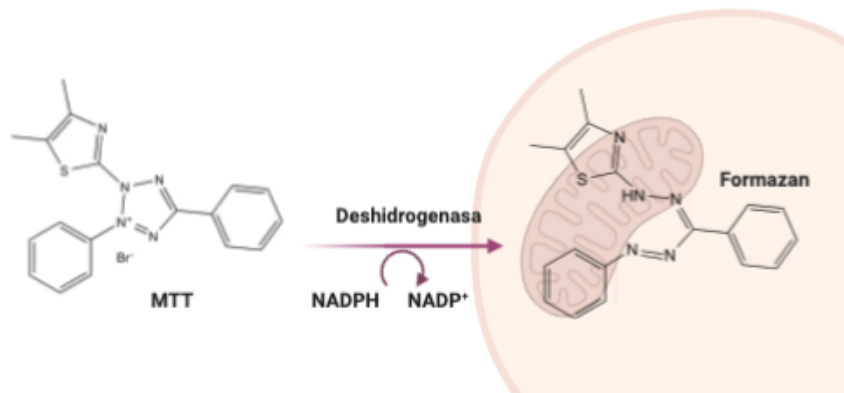


Figura 11. Reducción del MTT a Formazan. Imagen diseñada en BioRender.

Transcurridas las 24 h, se retira el medio DMEM (10% SFB) y se añade 1 mL de medio DMEM junto con el reactivo MTT, se incuba por 1 h a 37°C. Posteriormente se añade 1 mL de isopropanol al 10% para disolver los cristales formados, se disuelve mediante pipeteo y una vez transcurridos 20 min se mide absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como porcentaje, siendo el 100% las células utilizadas como control⁶⁷.

7.2.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este proyecto se analizaron utilizando el programa de análisis integral y estadísticas, Prism9. Las pruebas realizadas fueron *t* de *student* y ANOVA de dos vías considerando un valor de $p < 0.05$ como diferencia significativa.

8 RESULTADOS

8.1 Caracterización de compuestos fenólicos

8.1.2 Ensayos cualitativos

- Prueba de espuma

Las saponinas, son glucósidos hidrosolubles, que pueden tener propiedades tensoactivas y hemolíticas (considerados como agentes tóxicos para el consumo humano); sin embargo, hay estudios que demuestran que estas moléculas cuentan con una actividad biológica alta, en las cuáles se destaca su uso como insecticida, anti-agregante plaquetario, hipo-colesterolémico, y principalmente su capacidad antiinflamatoria⁶⁸.

Se determinó cualitativamente, si la testa de la variedad de frijol desarrollada por el INIFAP y la variedad comercial a estudiar, mostraban una presencia de saponinas en su estructura. Como se observa en la Figura 12, la línea superior representa la espuma generada después de agitar manualmente por dos minutos, una vez que se deja reposar se observa si la espuma se mantiene. La espuma disminuyó (marca inferior); este comportamiento se ve en ambas muestras.



Figura 12. Presencia de saponinas en las variedades Negro Albicampo y Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso. A) Negro Albicampo B) Flor de Junio. N=3

Ambos extractos mostraron una capacidad baja para formar espuma. Se sabe que los frijoles son una fuente importante de saponinas, sin embargo, la mayoría de estos

compuestos, se encuentran en los cotiledones de esta leguminosa, y son pocos los que se llegan a presentar en la testa del frijol.

- Prueba de Biuret (proteínas)

La prueba de Biuret, es una técnica colorimétrica específica para proteínas y péptidos. El compuesto de Biuret se forma cuando la urea es calentada, provocando la unión de dos moléculas de esta misma, formando grupos amida (-NH) en el centro de la molécula, estos grupos, pueden unirse a iones cobre en un pH básico, el complejo formado produce un color morado⁶⁹ (Figura 13).

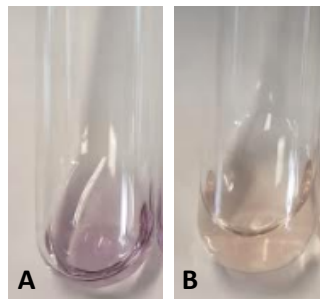


Figura 13. Presencia de proteínas Método de Biuret. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso. N=3

La muestra de la variedad Flor de Junio no muestra reacción positiva. Estudios han demostrado que los polifenoles tienen una alta capacidad de interaccionar con proteínas. Esta interacción da como resultado una disminución en la calidad de la proteína, provocando un cambio nutrimental importante⁷⁰. Como se muestra en este resultado, la variedad de Negro Albicampo muestra la coloración morada, siendo un resultado positivo para Biuret. Esto podría explicarse debido a que las variedades de frijol negro tienden a contener una mayor cantidad de polifenoles en la testa que pueden interactuar con proteínas, y más en esta leguminosa que se considera una fuente importante de proteína para la dieta tradicional mexicana.

- Prueba de Molisch (glucósidos)

La mayoría de los polifenoles que se encuentran en las plantas se encuentran glicosilados con diferentes unidades de azúcar y azúcares aciladas en diferentes posiciones del esqueleto del polifenol⁷¹.

La prueba de Molisch, permite detectar la presencia de hidratos de carbono en una muestra, se fundamenta en la formación de furfural o sus derivados, los cuales producen un complejo púrpura con el alfa-naftol. Como se observa en la Figura 14, ambas muestras dan resultados positivos, indicando que estos polifenoles, en efecto se encuentran glicosilados. La diferencia de tonalidades, se debe a que el frijol negro contiene una mayor cantidad de polifenoles que pudieran estar glicosilados, formando un complejo con una tonalidad más fuerte.

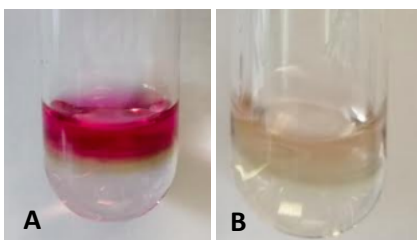


Figura 14. Presencia de glucósidos por la prueba de Molisch. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso. N=3

Algunos de los polifenoles que se pueden encontrar en la testa del frijol son antocianinas, principalmente: delphinidina, malvinidina y petunidina, glicosiladas en la posición 3-O; otros estudios que indican la presencia de quercetina-3-O-glucósido. Los polifenoles glicosilados tienen la capacidad formar complejos metálicos que bloquean la formación de radicales libres^{71,72}.

- Prueba de Mayer (alcaloides)

Los alcaloides son compuestos derivados del metabolismo de las plantas, encontrándose principalmente en las que presentan inflorescencias, como el maíz. La función de estos compuestos aún no se conoce realmente, sin embargo, se ha demostrado que pueden participar en la formación de la semilla, y se ven disminuidos

cuando se encuentra madura. Su presencia sirve de protección contra algunas especies de insectos⁷³.

La prueba de Mayer utiliza una solución de yoduro de potasio-mercurio, para precipitar los alcaloides presentes en una muestra; para la prueba de Dragendorff se utiliza una solución de yoduro de potasio-bismuto. En la [Figura 15](#), se observa la reacción utilizando el reactivo de Mayer, donde ambas muestras fueron negativas a la formación del precipitado naranja. La diferencia de color, se debe a que los polifenoles (en especial las antocianinas) presentan coloración rosa a pH ácidos.

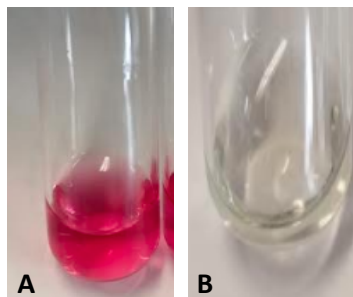


Figura 15. Presencia de alcaloides por el Método de Mayer. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso. N=3

- Prueba de Dragendorff (alcaloides)

Esta prueba, también se utiliza para la observar la presencia de alcaloides, y como se mencionó anteriormente, utiliza un reactivo de yoduro de potasio-bismuto, que precipita los alcaloides. Al igual que en la anterior, se observa un resultado negativo para ambas muestras ([Figura 16](#)), debido a que no se observó la formación de un precipitado naranja.

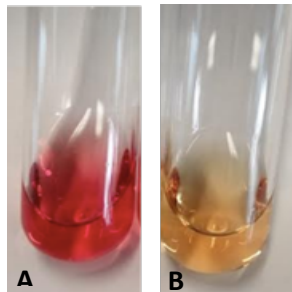


Figura 16. Presencia de alcaloides por el Método de Mayer. A) Negro Albicampo. B) Flor de Junio. Fotografía de Luzallie Jasso. N=3

Para continuar con la caracterización de los extractos polifenólicos, se realizaron pruebas cuantitativas, que permitirán determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos, así como su capacidad antioxidante.

8.1.3 Ensayos cuantitativos

Se realizaron las pruebas de fenoles totales, flavonoides totales, taninos totales y se midió la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Figura 17.

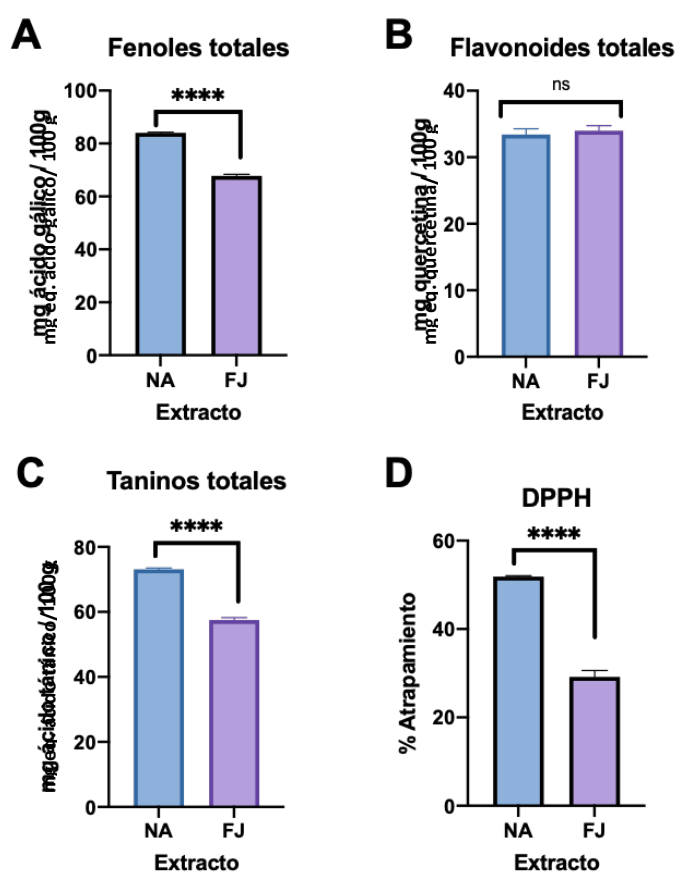


Figura 17. A) Fenoles totales (mg eq de ácido gálico/100g de muestra), B) flavonoides totales (mg eq. de quercetina/100g de muestra), C) taninos totales (mg eq. de ácido tánico/100g de muestra) y D) capacidad antioxidante DPPH (% de atrapamiento).**** $p < 0.0001$. $N=3$

Para la determinación de fenoles totales, se observa que el extracto derivado de Negro Albicampo, contiene una mayor cantidad de fenoles equivalentes a ácido gálico. Estos

resultados, corresponden con lo observado en la literatura para otras variedades de frijol negro, para Flor de Junio la cantidad de fenoles es menor, lo que corresponde con lo demostrado por grupos anteriores, donde las variedades coloridas (negro, rojas, moradas) muestran una mayor cantidad de polifenoles en su composición.

Los flavonoides totales son expresados en equivalentes de quercetina (compuesto de mayor proporción en leguminosas). Ambos extractos presentan un valor similar (~33 mg de quercetina/100 g de muestra). La presencia de quercetina ha sido relacionada con diferentes actividades biológicas, incluyendo el ser anticancerígena, anti-inflamatoria, tener actividad antiviral, además de disminuir la peroxidación de lípidos^{74,75}.

En el caso de la prueba de taninos totales, el extracto de la variedad Negro Albicampo, presenta una mayor cantidad (73.10 mg equivalentes de ácido tánico/100 g de muestra), mientras que Flor de Junio, presenta 57.48 mg eq. de ácido tánico/100 g de muestra. El color de la semilla es una de las características que indica cualitativamente el contenido de taninos totales; en estudios previos en diferentes variedades de frijol negro y bayo se ha demostrado que un color más oscuro tiende a presentar mayores valores de taninos, mientras que las variedades más claras, muestran un menor contenido de taninos^{76,77}.

El ensayo de DPPH nos muestra la capacidad antioxidante de los compuestos. Como se observa en la [Figura 17D](#) el extracto de NA tiene una mayor capacidad antioxidante, obteniendo un porcentaje de atrapamiento alrededor del 50%, en comparación con el derivado de FJ cuya capacidad antioxidante fue 30%.

Una vez obtenidas las caracterizaciones cualitativas y cuantitativas de los extractos, se probaron en la línea celular 3T3-L1.

8.2 Cultivo celular 3T3-L1

Las células 3T3-L1 son fibroblastos que aún mantienen la capacidad de diferenciarse dependiendo del estímulo al cual se encuentren expuestos. En la [Figura 18](#), se puede observar la morfología de las células después de ser sometidas a un tratamiento de diferenciación (Kit de diferenciación), y posteriormente mantenerlas en un medio

adicionado con insulina. Se observa la formación de gotículas de grasa, indicativo de que se están diferenciando en adipocitos y están almacenando grasa.

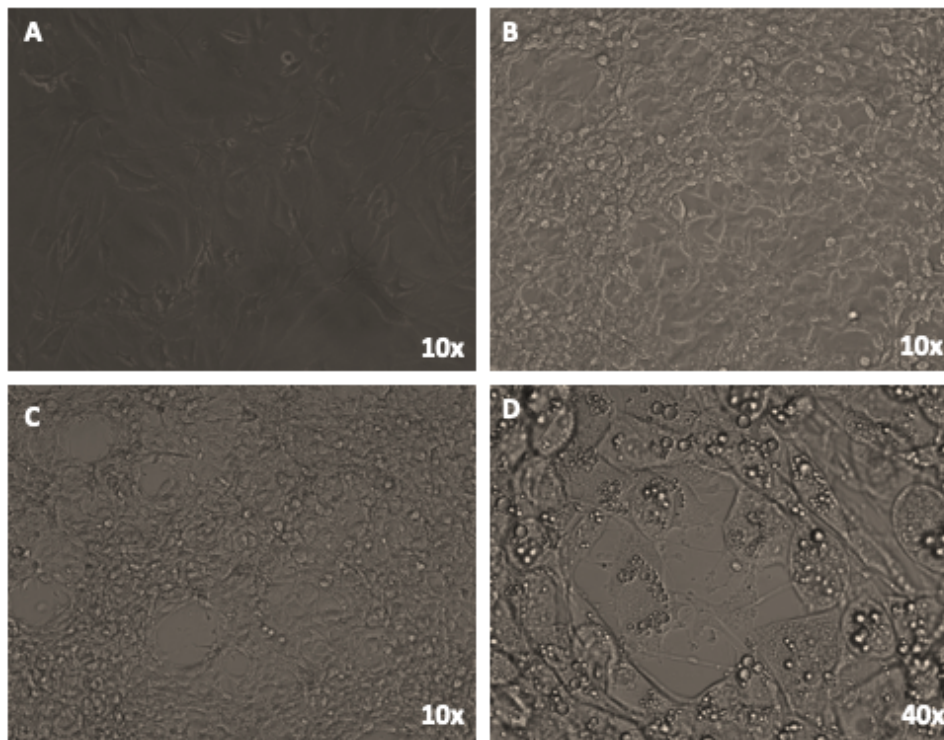


Figura 18. Crecimiento de la línea celular 3T3-L1. A) Día 10 de crecimiento de línea celular B) Día 2 después de ser expuestas al kit de diferenciación C) Día 9 después de la diferenciación y de mantenerlas con insulina D) Día 9 observadas con un mayor acercamiento donde se aprecian las gotas de grasa en una placa de 12 pozos . Fotografías tomadas en la Unidad de Investigación de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Una vez diferenciadas, se realizó el ensayo de citotoxicidad celular, utilizando ambos extractos en concentraciones de 0, 10, 80 y 150 ng de extracto/mL de medio.

8.2.1 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar si los extractos tenían un efecto citotóxico o benéfico en las células tratadas con LPS, se colocaron las concentraciones de los extractos antes mencionadas en dos diferentes ocasiones. La primera, los extractos fueron añadidos durante la diferenciación de las células a adipocitos (5 días con renovación de medio cada 2 días), y la segunda ocasión, los extractos se colocaron cuando las células ya habían alcanzado su diferenciación (24 h). En el quinto día, las células tratadas pre y post diferenciación fueron expuestas a LPS (1000 ng/mL) durante 24 h. En la Figuras 19 se muestran los resultados.

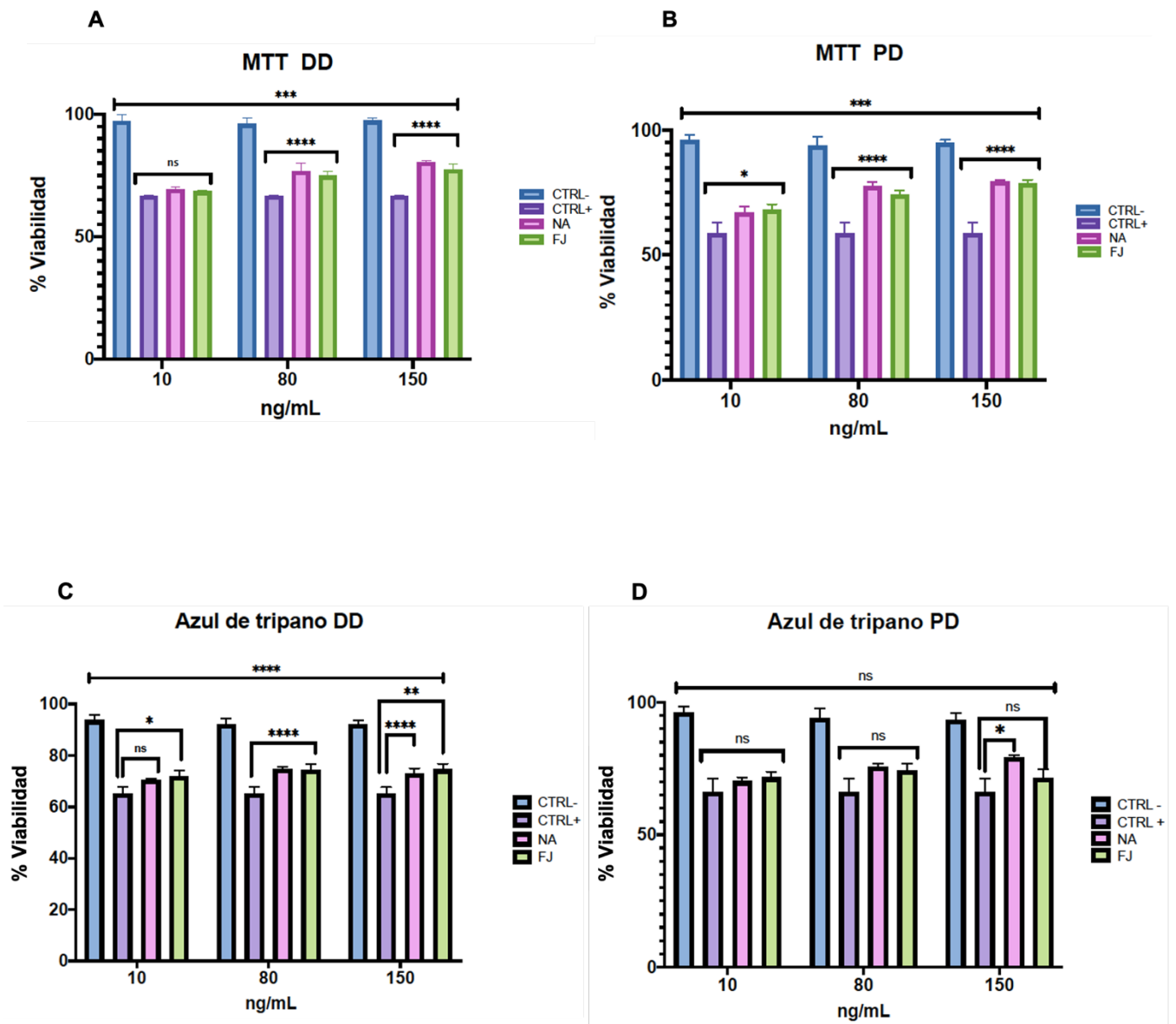


Figura 19. Ensayos de viabilidad celular por MTT y azul de tripano. A) MTT. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos durante la diferenciación y expuestas a LPS por 24h, B) MTT. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos post-diferenciación y expuestas a LPS por 24h, C) Azul de tripano. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos durante la diferenciación y expuestas a LPS por 24h y D) B) Azul de tripano. Células 3T3-L1 tratadas con los extractos polifenólicos post-diferenciación y expuestas a LPS por 24h. DD: durante diferenciación, PD: post-diferenciación. N=4 * $p < 0.1$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0003$, **** $p < 0.0001$, ns=no significancia.

En la [Figura 19A](#) y [19B](#), se observa que los tratamientos con los extractos durante y post-diferenciación, a pesar de ser expuestos a LPS, logran aumentar la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración del extracto. A pesar de ser un ensayo utilizado comúnmente y ser altamente reproducible, se quiso corroborar la información con el ensayo de azul de tripano cuyos resultados se muestran de igual manera en la [Figura 19C](#) y [Figura 19D](#).

El uso del azul de tripano para conteo celular se basa en la capacidad de las membranas celulares para excluir ciertos colorantes como la eosina, propidio y el azul de tripano, por lo que aquellas que mantuvieron un color transparente con un halo azul fueron contadas como células viables⁶⁶.

En este ensayo ([Figura 19C](#) y [Figura 19D](#)), se observa que la adición de los extractos polifenólicos post-diferenciación y LPS no influyen de manera significativa en la viabilidad celular en comparación con las células tratadas solo con LPS. Sin embargo, en las células tratadas con los extractos durante la diferenciación se observa que el uso de los compuestos influye de manera positiva en la viabilidad celular.

9 DISCUSIÓN

La obesidad se ha convertido en un problema de suma importancia a nivel mundial. En el año 2020 comenzó la pandemia por el virus SARS-CoV2 que provoca la enfermedad de COVID-19 teniendo como uno de los factores de riesgo más importantes la obesidad. Esta condición ha estado presente y ha aumentado a lo largo del tiempo, debido a un incremento en el consumo de alimentos procesados cuyos principales ingredientes son el azúcar, grasas o sodio, dejando de lado una alimentación que incluya vegetales, leguminosas y frutas frescas, todos ricos en compuestos polifenólicos. La situación de más de una tercera parte de la población se ve empeorada por el sedentarismo y la falta de actividad física.

Los polifenoles, son metabolitos secundarios que se estudian cada vez más, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiadipogénicas, por lo que cada vez se encuentra más información al respecto de sus beneficios a la salud.

En los resultados de este proyecto, se muestra la caracterización cualitativa y cuantitativa de dos extractos polifenólicos derivados de dos variedades de frijol: Negro Alicampo (variedad negro) y Flor de Junio (variedad bayo).

El frijol Negro Alicampo, mostró una mayor cantidad de polifenoles y porcentaje de atrapamiento del radical DPPH en comparación con el frijol Flor de Junio. Los polifenoles, en especial las antocianinas que se han reportado presentes en *Phaseolus vulgaris* son la delfinidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido y malvinidina 3-glucósido, siendo la primera la que se encuentra en una mayor proporción⁷⁷. Como se menciona, las antocianinas se encuentran glicosiladas en su mayoría y esto se comprobó con la prueba de Molisch, en donde ambos extractos mostraron la presencia de azúcares en su composición.

En las pruebas cualitativas de caracterización, se evaluó la presencia de otros compuestos, debido a que los polifenoles pueden interactuar con otras moléculas y unirse a ellos. Entre los compuestos que pueden interactuar con los polifenoles se encuentran las proteínas, en donde se ha visto que la interacción de polifenoles-proteínas da como resultado una disminución en la calidad de la proteína, provocando un cambio nutricional importante. Budryn et. al⁷⁰, evaluó tres aislados de proteína y los hizo interactuar con diferentes polifenoles, observando un aumento en la masa molecular pero también la

degradación de aminoácidos esenciales, así como una limitación en la digestión proteólica y solubilidad de proteínas.

Para evaluar si estos compuestos podrían utilizarse como un prototipo de suplemento para personas que sufren de obesidad, se realizaron dos ensayos de viabilidad celular (MTT y azul de tripano). Es importante mencionar que en un estado de obesidad hay un estado de inflamación crónica debido al crecimiento tanto de tamaño como de número de adipocitos, por ello durante el ensayo se agregó LPS a las células 3T3-L1 y provocar un estado de inflamación. El LPS es un compuesto de la membrana de las células Gram (-) y el efecto que tiene en modelos *in vitro* provoca un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, así como la disminución de la viabilidad celular^{78,79,80}.

El uso de LPS fue para simular la condición de inflamación crónica que se encuentra en un estado de obesidad y que provoca la muerte celular⁸¹. Ambos extractos se utilizaron en etapas distintas de la diferenciación celular; el primero fue el uso de los extractos polifenólicos durante la exposición a glucocorticoides, y la segunda fue cuando las células ya se encontraban diferenciadas.

En diversos estudios se ha demostrado el uso de polifenoles para atenuar los efectos causados por el LPS en diferentes líneas celulares. Por ejemplo, el grupo de Ma J. et al⁸² demostró que el resveratrol inhibe los efectos causados por el LPS en células osteoblásticas además de aumentar la expresión de genes antiinflamatorios, siendo este efecto dosis-dependiente. También se ha demostrado que otros polifenoles derivados de flores o cáscaras de frutos inhiben la apoptosis celular y atenuan el estado de inflamación causado por LPS en modelos *in vitro* de células neuronales, cancerígenas incluyendo cáncer de estómago^{83,84}.

En la literatura, se han reportado más estudios acerca de las variedades negras de frijoles, y prácticamente no hay información detallada acerca de qué tan beneficiosos son los frijoles bayos. Por lo anterior se decidió incluir una variedad comercial de frijol bayo (Flor de Junio) para contrastarla con la variedad negra desarrollada por el INIFAP (negro Albicampo). Como se observó en los ensayos de viabilidad celular, el frijol bayo ensayado también mostró un efecto positivo en la viabilidad tanto durante, como en etapas post-

diferenciación. Una posible ventaja de los frijoles bayos es que, en comparación con las variedades negras, proporcionarían una mayor biodisponibilidad de hierro⁸⁵.

Tako E.⁸⁶ en 2010, estudió y demostró que los polifenoles que se encuentran en las variedades de frijol coloridos son los causantes de la poca absorción que se tiene del hierro en el organismo. Sin embargo, las variedades bayo por la baja cantidad de polifenoles que muestran, resultan ser una fuente importante de hierro, en modelos *in vitro* se ha observado una mayor producción de ferritina. Cabe mencionar, que en una condición de obesidad se tiene una mayor deficiencia de hierro debido a que las moléculas liberadas en estas condición tienden a modificar la síntesis de hepcidina y suprimen la eritropoiesis provocando la llamada anemia crónica (ACD)^{87,88}.

Para finalizar, ambas variedades muestran resultados importantes en cuanto a su caracterización polifenólica como en los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*. Hay una mejora en la viabilidad celular utilizando los extractos polifenólicos aún después de ser sometidas estas células a un reto con LPS, lo que permite realizar estos estudios en un modelo *in vivo*, evaluando diferentes rutas metabólicas en las que se sabe que los polifenoles podrían tener un impacto benéfico para la salud.

10 CONCLUSIONES

Se demostró que el uso de extractos polifenólicos provenientes de dos variedades de frijol (Negro Albicampo y Flor de Junio) aumentan la viabilidad celular de las células 3T3-L1 expuestas a LPS. Aunado esto, se mostró que la variedad Negro Albicampo contiene una mayor cantidad de polifenoles y capacidad antioxidante que la variedad Flor de Junio; sin embargo, ambas muestran valores similares para flavonoides totales.

11 PERSPECTIVAS

- Estudiar los extractos polifenólicos de ambas variedades en un modelo de obesidad *in vivo* y observar su respuesta ante moléculas pro inflamatorias, además de la evaluación de parámetros bioquímicos como: triglicéridos, colesterol y glucosa.
- Realizar una separación de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de la variedad negro y evaluar cuál de ellos podría tener la acción antioxidante o antiinflamatoria.
- Debido a la baja cantidad de polifenoles encontrados en la variedad bayo, se propone estudiar a la leguminosa completa en un modelo de obesidad *in vivo*, evaluando su respuesta en el metabolismo y absorción de hierro.

12 REFERENCIAS

1. Fontaine, K. R., Redden, D. T., Wang, C., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2003). Years of life lost due to obesity. *JAMA*, 289(2), 187–193. <https://doi.org/10.1001/jama.289.2.187>.
2. World Health Organization. Obesity [Internet] Geneva: WHO; 2008. [cited 2020 September 16]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
3. Baraldi, L. G., Martinez Steele, E., Canella, D. S., & Monteiro, C. A. (2018). Consumption of ultra-processed foods and associated sociodemographic factors in the USA between 2007 and 2012: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ open*, 8(3), e020574. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020574>.
4. Machado, P. P., Steele, E. M., Levy, R. B., Sui, Z., Rangan, A., Woods, J., Gill, T., Scrinis, G., & Monteiro, C. A. (2019). Ultra-processed foods and recommended intake levels of nutrients linked to non-communicable diseases in Australia: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ open*, 9(8), e029544. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029544>
5. Lee, H., Lee, I. S., & Choue, R. (2013). Obesity, inflammation and diet. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, 16(3), 143–152. <https://doi.org/10.5223/pghn.2013.16.3.143>
6. Chan, C. Y., Wei, L., Castro-Muñozledo, F., & Koo, W. L. (2011). (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. *Life sciences*, 89(21-22), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.006>
7. Ku, Hui-chen & Liu, Hang-Seng & Hung, Pei-Fang & Chen, Chialin & Liu, Hsien-Chun & Chang, Hsin-Huei & Tsuei, Yi-Wei & Shih, Li-Jane & Lin, Ching-ling & Lin, Chih-Ming & Kao, Yung-Hsi. (2012). Green tea (-)-Epigallocatechin gallate inhibits IGF-I and IGF-II stimulation of 3T3-L1 preadipocytemitogenesis via the 67-kDa laminin receptor, but not AMP-activated protein kinase pathway. *Molecular nutrition & food research*. 56. 580-92. [10.1002/mnfr.201100438](https://doi.org/10.1002/mnfr.201100438)

8. Park, Y.-J., Seo, D.-W., Ju, J.-Y., Cha, Y.-Y., & An, H.-J. (2019). The Antiobesity Effects of Buginawa in 3T3-L1 Preadipocytes and in a Mouse Model of High-Fat Diet-Induced Obesity. *BioMed Research International*, 2019, 3101987. <https://doi.org/10.1155/2019/3101987>
9. Hernández Velázquez, I. A. (2018). Efecto de un concentrado de proteína de frijol y de frijol entero en un modelo de obesidad, y su efecto en la microbiota intestinal (Maestría en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México.
10. M. Sánchez-Tapia, I. Hernández-Velázquez, E. Pichardo-Ontiveros, O. Granados-Portillo, A. Gálvez, A. R. Tovar and N. Torres. Consumption of Cooked Black Beans Stimulates a Cluster of Some Clostridia Class Bacteria Decreasing Inflammatory Response and Improving Insulin Sensitivity. *Nutrients*. 2020. 12, 1182; doi:10.3390/nu12041182
11. Jasso Mata, L. (2019). Nutrimientos y compuestos funcionales de variedades de frijol del centro de México (Licenciada en Química de Alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México.
12. García Sánchez, I., Pérez Alonso, C. (2013). Elaboración de un suplemento dietético a base de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) mediante secado por aspersion. (Licenciatura en Ingeniería Química). Universidad Autónoma del Estado de México
13. World Health Organization. (2016). Obesidad y sobrepeso. WHO Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
14. Causes of Obesity. (2016). World Obesity Federation. <https://www.worldobesity.org/about/about-obesity/causes-of-obesity>.
15. Devaux, M., & Sassi, F. (2015). The Labour Market Impacts of Obesity, Smoking, Alcohol Use and Related Chronic Diseases. <https://doi.org/10.1787/5jrqn5fvpv0v-en>.
16. Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). La Obesidad en México. Estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control (ISBN: 978-607-511-179-7). <https://www.insp.mx/avisos/4884-la-obesidad-mexico.html>.

17. Gaona-Pineda, E. B., Martínez-Tapia, B., Arango-Angarita, A., Valenzuela-Bravo, D., Gómez-Acosta, L. M., Shamah-Levy, T., & Rodríguez-Ramírez, S. (2018). Consumo de grupos de alimentos y factores sociodemográficos en población mexicana. *Salud Pública de México*, 60(3, may-jun), 272. <https://doi.org/10.21149/8803>.
18. Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of medical science : AMS*, 13(4), 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>.
19. Flores, M.; Barquera, S.; Carrión, C. Inflamación obesidad y diabetes mellitus tipo 2. (2006). In *Sobrepeso y Obesidad*, 1st ed.; Barquera, S., Tolentino, L., Rivera, J., Eds.; Instituto Nacional de Salud Pública: México, México.
20. Bernlohr DA, Jenkins AE, Bennaars AA (2002). Adipose tissue and lipid metabolism. In: Vence JE, Vence D, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. Elsevier Science: Amsterdam; pp. 263–89
21. Calabro, P., & Yeh, E. T. (2007). Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Sub-cellular biochemistry*, 42, 63–91.
22. Montanari, T., Pošćić, N., & Colitti, M. (2017). Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(5), 495–513. <https://doi.org/10.1111/obr.12520>.
23. Berry, R., Rodeheffer, M. S., Rosen, C. J., & Horowitz, M. C. (2015). Adipose Tissue Residing Progenitors (Adipocyte Lineage Progenitors and Adipose Derived Stem Cells (ADSC). *Current molecular biology reports*, 1(3), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0018-y>.
24. Macdougald, O. A. (2014). *Methods of Adipose Tissue Biology Part A (Volume 537) (Methods in Enzymology, Volume 537) (1st ed.)*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5>.
25. Cave, E., & Crowther, N. J. (2019). The Use of 3T3-L1 Murine Preadipocytes as a Model of Adipogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 263–272. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_25.

26. Liu, X., Malki, A., Cao, Y., Li, Y., Qian, Y., Wang, X., & Chen, X. (2015). Glucose- and Triglyceride-lowering Dietary Penta-O-galloyl- α -D-Glucose Reduces Expression of PPAR γ and C/EBP α , Induces p21-Mediated G1 Phase Cell Cycle Arrest, and Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 123(5), 308–316. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1548789>.
27. Chang, E., & Kim, C. Y. (2019). Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1157. <https://doi.org/10.3390/molecules24061157>.
28. Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
29. Chuan Wang, Camille L.A. Hamula, Xing-Fang Li, Xin Liu, Jianjun Li. (2010). 6.06 - Glycoanalysis of Bacterial Glycome, Editor(s): Hung-Wen (Ben) Liu, Lew Mander, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, Pages 157-173, ISBN 9780080453828, <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00130-1>.
30. Silipo, A., & Molinaro, A. (2010). The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides. *Sub-cellular biochemistry*, 53, 69–99. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_4
31. Sandra M. Fox-Moon, Mark E. Shirtliff. (2015). Chapter 77 - Urinary Tract Infections Caused by *Proteus mirabilis*, Editor(s): Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman, *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, Pages 1389-1400, ISBN 9780123971692, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00077-9>.
32. Chirumbolo, S., Franceschetti, G., Zoico, E., Bambace, C., Cominacini, L., & Zamboni, M. (2014). LPS response pattern of inflammatory adipokines in an in vitro 3T3-L1 murine adipocyte model. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*, 63(6), 495–507. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0721-9>

33. Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
34. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00235-1)
35. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
36. Nash, V., Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J., Kellett, J., & Naumovski, N. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota - A systematic review. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 113, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>
37. 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. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
38. Belitz, H.D., Grosch, W. and Schieberle, P. (2009) *Food Chemistry*. 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1070 p.
39. Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., & Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>
40. Wolfram, S., D. Raederstorff, Y. Wang, S. R. Teixeira, V. Elste, and P. Weber. 2005. TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Annals of Nutrition and Metabolism* 49 (1):54–63. doi: 10.1159/000084178.

41. Wu, T., Q. Tang, Z. Gao, Z. Yu, H. Song, X. Zheng, and W. Chen. 2013. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLoS One* 8 (10):e77585doi: 10.1371/journal.pone.0077585.
42. Pan, M. H., , Li, M. Y., , Tsai, M. L., , Pan, C. Y., , Badmaev, V., , Ho, C. T., , & Lai, C. S., (2019). A mixture of citrus polymethoxyflavones, green tea polyphenols and lychee extracts attenuates adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and obesity-induced adipose inflammation in mice. *Food & function*, 10(12), 7667–7677. <https://doi.org/10.1039/c9fo02235j>
43. Zhu, X., Yang, J., Zhu, W., Yin, X., Yang, B., Wei, Y., & Guo, X. (2018). Combination of Berberine with Resveratrol Improves the Lipid-Lowering Efficacy. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3903. <https://doi.org/10.3390/ijms19123903>
44. Pacifici, F., Farias, C., Rea, S., Capuani, B., Feraco, A., Coppola, A., Mammi, C., Pastore, D., Abete, P., Rovella, V., Salimei, C., Lombardo, M., Caprio, M., Bellia, A., Sbraccia, P., Di Daniele, N., Lauro, D., & Della-Morte, D. (2020). Tyrosol May Prevent Obesity by Inhibiting Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 4794780. <https://doi.org/10.1155/2020/4794780>
45. Seo, Y. J., Kim, K. J., Choi, J., Koh, E. J., & Lee, B. Y. (2018). Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, 10(6), 712. <https://doi.org/10.3390/nu10060712>.
46. Wang, J., Zhang, L., Dong, L., Hu, X., Feng, F., & Chen, F. (2019). 6-Gingerol, a Functional Polyphenol of Ginger, Promotes Browning through an AMPK-Dependent Pathway in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(51), 14056–14065. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05072>
47. Zielińska-Wasielica, J., Olejnik, A., Kowalska, K., Olkowicz, M., & Dembczyński, R. (2019). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit Extract Alleviates Oxidative Stress, Insulin Resistance, and Inflammation in Hypertrophied 3T3-L1 Adipocytes and Activated RAW 264.7 Macrophages. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(8), 326. <https://doi.org/10.3390/foods8080326>

48. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019, 28 junio). La importancia del frijol en México. gov.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-del-frijol-en-mexico?idiom=es>.
49. Pesquera, A. I. D. S. Y. (2020, 5 marzo). Boletín mensual de avance de la producción de frijol. gov.mx. <https://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-mensual-de-avances-de-la-produccion-de-frijol-103826>.
50. Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., & Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food chemistry*, 107(1), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.038>.
51. Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(8), 1360. <https://doi.org/10.3390/molecules22081360>.
52. Aguilera, Y., Mojica, L., Rebollo-Hernanz, M., Berhow, M., de Mejía, E. G., & Martín-Cabrejas, M. A. (2016). Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. *Food chemistry*, 212, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.022>.
53. Mojica, L., Berhow, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food chemistry*, 229, 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.124>.
54. Luthria, D. L., & Pastor-Corrales, M. A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.09.003>.
55. Huber, K. (2016). Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 06(05), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000551>.
56. Torres-Pacheco, I. (2006). Bioactive components in common beans (. *Research Signpost*, 661(2), 217–236.

57. Grupo REFORMA | Periodismo independiente. (2020). Moises Ramírez. <https://www.reforma.com/libre/acceso/accesofb.htm?urlredirect=/disminuye-40-produccion-de-frijol/ar1853135>
58. Medinilla, B. (1993). Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp 8-9.
59. Sofowora, A. (1993) Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. Spectrum Books Ltd., Ibadan, 191-289.
60. Wokes, F., & Still, B. M. (1942). The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. *Biochemical Journal*, 36(10–12), 797–806. <https://doi.org/10.1042/bj0360797>
61. Evans WC. Pharmacology (1997). Singapore: Harcourt Brace and Company. 226.
62. Kokate CK (2001). Practical pharmacognosy. New Delhi: Vallabh Prakarshan. 45–49.
63. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
64. Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
65. HATANO, T., KAGAWA, H., YASUHARA, T., & OKUDA, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090–2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>
66. Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Appendix 3, . <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
67. Rivero-Cruz, J. F., Granados-Pineda, J., Pedraza-Chaverri, J., Pérez-Rojas, J. M., Kumar-Passari, A., Diaz-Ruiz, G., & Rivero-Cruz, B. E. (2020). Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic

- Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(1), 70. <https://doi.org/10.3390/antiox9010070>
68. Valdés, L. & Tamargo Santos, Beatriz & Olivet, E. & Paredes, L.E. & Hernández, Y. & Otero, Anselmo & Sierra, Gustavo. (2015). Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 20. 106-116.
69. Wokes, F., & Still, B. M. (1942). The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. *The Biochemical journal*, 36(10-12), 797–806. <https://doi.org/10.1042/bj0360797>.
70. Budryn, G., Zaczyńska, D., Rachwał-Rosiak, D., & Oracz, J. (2015). Changes in properties of food proteins after interaction with free and β -cyclodextrin encapsulated hydroxycinnamic acids. *European Food Research and Technology*, 240(6), 1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2419-9>
71. Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
72. Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>.
73. Kohnen-Johannsen, K. L., & Kayser, O. (2019). Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(4), 796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>.
74. Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(6), 1123. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>.
75. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>.

76. Bressani, Roberto & ELIAS, L. & WOLZAK, A. & Hagerman, Ann & BUTLER, L. (2006). Tannin in Common Beans: Methods of Analysis and Effects on Protein Quality. *Journal of Food Science*. 48. 1000 - 1001. 10.1111/j.1365-2621.1983.tb14954.x.
77. Yoshida, K., Y. Sato, R. Okuno, K. Kameda, M. Isobe, and T. Kondo. 1996. Structural analysis and measurements of anthocyanins from coloured seed coats of *Vigna*, *Phaseolus* and *Glycine* legumes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(4): 589-59
78. Zhang, Q., Wang, Y., Zhang, M., & Ying, H. (2019). Green tea polyphenols attenuate LPS-induced inflammation through upregulating microRNA-9 in murine chondrogenic ATDC5 cells. *Journal of cellular physiology*, 234(12), 22604–22612. <https://doi.org/10.1002/jcp.28826>.
79. Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1784, 119–126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12.
80. Cohly, H., Stephens, J., Markhov, A., Angel, M., Campbell, W., Ndebele, K., & Jenkins, J. (2001). Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages. *Immunological investigations*, 30(1), 1–15. <https://doi.org/10.1081/imm-100103686>
81. Hellweg, C. E., Arenz, A., Bogner, S., Schmitz, C., & Baumstark-Khan, C. (2006). Activation of nuclear factor kappa B by different agents: influence of culture conditions in a cell-based assay. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091, 191–204. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.066>
82. Ma, J., Wang, Z., Zhao, J., Miao, W., Ye, T., & Chen, A. (2018). Resveratrol Attenuates Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Inhibition of Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 2045–2052. <https://doi.org/10.12659/msm.905703>
83. Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Yang, M., & Hou, C. (2019). Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via

- the suppression of TLR4/NF- κ B pathway activation. *Food & nutrition research*, 63, 10.29219/fnr.v63.3392. <https://doi.org/10.29219/fnr.v63.3392>.
84. Zhang, R. R., Hu, R. D., Lu, X. Y., Ding, X. Y., Huang, G. Y., Duan, L. X., & Zhang, S. J. (2020). Polyphenols from the flower of *Hibiscus syriacus* Linn ameliorate neuroinflammation in LPS-treated SH-SY5Y cell. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 130, 110517. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110517>.
85. Tako, E., & Glahn, R. P. (2010). White beans provide more bioavailable iron than red beans: studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 80(6), 416–429. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000028>
86. Tako, E., & Glahn, R. P. (2010). White beans provide more bioavailable iron than red beans: studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 80(6), 416–429. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000028>.
87. Zhao, L., Zhang, X., Shen, Y., Fang, X., Wang, Y., & Wang, F. (2015). Obesity and iron deficiency: a quantitative meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(12), 1081–1093. <https://doi.org/10.1111/obr.12323>.
88. Rodrigues de Morais, T., & Gambero, A. (2019). Iron chelators in obesity therapy - Old drugs from a new perspective?. *European journal of pharmacology*, 861, 172614. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172614>.