

Efecto antihipertensivo de extractos fenólicos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) bioprocesado por fermentación en estado sólido. Evaluación *in vivo*

M.J. Vega-Burgueño^{1*}, L.M. Sánchez-Magaña¹, F. Cabrera-Chávez², F. Delgado-Vargas¹, J.X.K. Perales-Sánchez¹, C. Reyes-Moreno¹, R. Gutiérrez-Dorado¹.

1 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin. **2** Laboratorio de investigación 2, Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin. *meeli.vb@hotmail.com.

RESUMEN:

La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. El frijol común es una excelente fuente de compuestos bioactivos relacionados a capacidad antihipertensiva, destacando los compuestos fenólicos. Se ha reportado que la fermentación en estado sólido (FES) incrementa estos compuestos. El objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto de la FES sobre la propiedad antihipertensiva *in vivo* de frijol común cv Azufrado Higuera. Se utilizó el hongo *Rhizopus oligosporus* y ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se administraron 4 concentraciones de extractos fenólicos (50, 150, 250 y 500 mg/kg), Captopril (10 mg/kg) como control positivo y agua destilada como control negativo. Para la medición de la presión arterial sistólica (PAS) se utilizó el equipo CODA (Kent Scientific). Los extractos de fenólicos libres y ligados de frijol fermentado (tempe) a una concentración de 500 mg/kg fueron los tratamientos que causaron las mayores disminuciones en los valores de PAS a los diferentes tiempos estudiados, y no se presentaron diferencias significativas con el Captopril a las 6 h de estudio. Por lo tanto, el tempe de frijol común representa una potencial alternativa natural para el control de la presión arterial en personas que sufren de este padecimiento.

Palabras clave: Hipertensión arterial, frijol común, compuestos fenólicos, fermentación en estado sólido, tempe, *Rhizopus oligosporus*.

ABSTRACT:

High blood pressure is one of the main risk factors for the development of cardiovascular disease. Common bean is an excellent source of bioactive compounds related to antihypertensive capacity, emphasizing the phenolic compounds. Solid-state fermentation (SSF) has been reported to increase these types of compounds. The objective of this project was study the effect of SSF on the *in vivo* antihypertensive property of common bean cv Azufrado Higuera. The fungus *Rhizopus oligosporus*, and spontaneously hypertensive rats (SHR) were used. Four concentrations of phenolic extracts (50, 150, 250 and 500 mg / kg), Captopril (10 mg / kg) as positive control and distilled water as negative control were administered. For the measurement of systolic blood pressure (SBP) the CODA equipment (Kent Scientific) was used. The free and bound extracts of fermented bean (tempe) at a concentration of 500 mg / kg were the treatments that caused the largest decreases in SBP values at the different times studied, and there were no significant differences with Captopril at 6 h of study. Therefore, common bean tempe represents a potential natural alternative for the control of blood pressure in people suffering from this condition.

Keywords: High blood pressure, common bean, phenolic compounds, solid-state fermentation, tempeh, *Rhizopus oligosporus*.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es uno de los principales factores que predisponen al desarrollo y complicación de enfermedad cardiovascular. En México, la prevalencia de hipertensión arterial en el año 2012 fue de 31.5%, siendo más alta en adultos con obesidad y diabetes (Romero-Martínez, Shamah-Levy y col. 2013). El tratamiento principal para esta enfermedad involucra tanto tratamientos no farmacológicos como la terapia dietética y cambios de estilo de vida, así como medicamentos sintéticos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (Crisan y Carr 2000). Recientemente se han encontrado algunos inhibidores naturales de la enzima convertidora de angiotensina I en diferentes fuentes, principalmente fuentes vegetales como las leguminosas. En estos granos se reporta una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden ser considerados compuestos bioactivos debido a su actividad antioxidante (AAox), además de muchos otros fitoquímicos como flavonoides y ácidos fenólicos, que han ganado atención como agentes antihipertensivos (Quiñones y col. 2012).

En la actualidad, el frijol suele consumirse a través de diversos procesamientos. La fermentación es uno de ellos y representan un tercio del consumo total de alimentos a nivel mundial. Se ha demostrado que estos productos son altos en actividad antioxidante en comparación al alimento crudo. La fermentación en estado sólido (FES), es un proceso biotecnológico que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial; sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para permitir el crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos. Uno de los productos elaborados a partir de este proceso es el tempe, un alimento de origen indonés principalmente obtenido a partir de soya con la inoculación de hongos filamentosos, sin embargo, diversos estudios han probado este bioproceso con otras leguminosas como el frijol. La mejora de la actividad antioxidante de alimentos fermentados a base de granos durante la fermentación en estado sólido, se debe a la liberación de compuestos fenólicos llevada a cabo por la hidrólisis enzimática por el hongo, la cual cataliza la liberación de ácidos fenólicos y flavonoides conjugados. Muchos de estos fitoquímicos que se ven mejorados con la FES, se les han conferido diversas propiedades nutraceuticas, como potencial antihipertensivo (Torino y col. 2013).

Existen escasos estudios del efecto del bioprocésamiento por fermentación en estado sólido sobre la propiedad antihipertensiva *in vitro* de frijol común, empleando el hongo *Rhizopus Oligosporus* (Rochín-Medina y col, 2015); mientras el efecto de la FES sobre la actividad antihipertensiva *in vivo* de esta leguminosa no ha sido estudiado. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la FES sobre la propiedad antihipertensiva *in vivo* de frijol común variedad Azufrado Higuera empleando el hongo *Rhizopus Oligosporus*.

En el presente trabajo de investigación se encontró que los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de frijol fermentado (tempe) a una concentración de 500 mg/kg fueron los tratamientos que causaron las mayores disminuciones en los valores de la presión arterial sistólica (PAS) a los diferentes tiempos estudiados. La disminución de PAS en ratas hipertensas ocasionada por estos tratamientos no presentó diferencias significativas con el Captopril a las 6 h de estudio, sin embargo, en tiempos menores a 6 h (1.5, 3, 4.5 h), posteriores a la administración de los tratamientos, los extractos de fenólicos libres y ligados de tempe de frijol (500 mg/kg) causaron una mayor disminución de PAS que las ratas tratadas con Captopril. Por lo tanto, se puede decir que el proceso de FES mejoró significativamente la capacidad antihipertensiva en el frijol común Azufrado Higuera, y que el tempe de esta leguminosa representa una potencial alternativa natural para el control de la presión arterial en personas que sufren de este padecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como materia prima se utilizó frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Azufrado de Higuera. Para la inoculación del tempe, se utilizó el hongo *Rhizopus oligosporus* NRRL 270.

Elaboración de harina de frijol común bioprocesado (tempe)

Para la elaboración de la harina de frijol fermentado, el frijol se sometió a un periodo de remojo por 4 horas con agua destilada, se descascarilló y las cascarillas fueron recolectadas y secadas. Posteriormente este se llevó a cocción a 90°C por 30 min. El frijol se inoculó con una solución de esporas de *Rhizopus oligosporus* (10⁶ esporas/mL). Para su incubación se siguieron las condiciones optimizadas por León Murillo y col (2016), con 33.5°C y 108 h de fermentación. Una vez finalizada la incubación, el tempe se sometió a secado a 50°C por 8 horas y se molió con sus respectivas cascarillas. Se preparó una harina de frijol crudo para su comparación.

Extracción de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos libres y ligados se extrajeron de acuerdo a la metodología de Adom y Liu (2002). Para la obtención de la fracción libre de los fenólicos, 25 gramos de muestra se mezclaron con 100 mL de etanol al 80%, y el sobrenadante fue recuperado. Se realizó una segunda extracción con otro volumen de 100 mL del mismo solvente a la misma muestra. El sobrenadante de las dos extracciones se concentró y se llevó a secado para su posterior reconstitución. Para la fracción ligada, a partir del precipitado de la anterior extracción, se le realizó una hidrólisis alcalina con NaOH, se neutralizó con HCl y se realizaron dos extracciones con acetato de etilo. El sobrenadante se concentró y se llevó a secado para su posterior reconstitución.

Ensayo *in vivo* de capacidad antihipertensiva

El potencial antihipertensivo de la harina de frijol fermentado se determinó mediante la metodología de Fritz y col. (2011) con ligeras modificaciones. Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron en condiciones estándar (23°C, ciclos de 12 h de luz-oscuridad, consumo de agua *ad-libitum*), con un acondicionamiento previo al experimento de 12 h de ayuno. Se trabajó con ocho grupos de seis ratas cada uno, al grupo control positivo se le suministró medicamento comercial (Captopril), un grupo control negativo (placebo) y seis grupos en los que se utilizaron diferentes dosis de extractos libres y ligados secos de compuestos fenólicos (50, 150, 250 y 500 mg/kg) administrados vía reto intragástrico. La presión arterial se midió a diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 h) posterior a la administración del suplemento. Se utilizó el equipo CODA tail cuff blood pressure system de Kent Scientific para la medición de la presión arterial. Se determinó el promedio de 25 mediciones y los resultados se expresaron como disminución de la presión sistólica [Δ PAS (mmHg)] utilizando la siguiente ecuación:

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

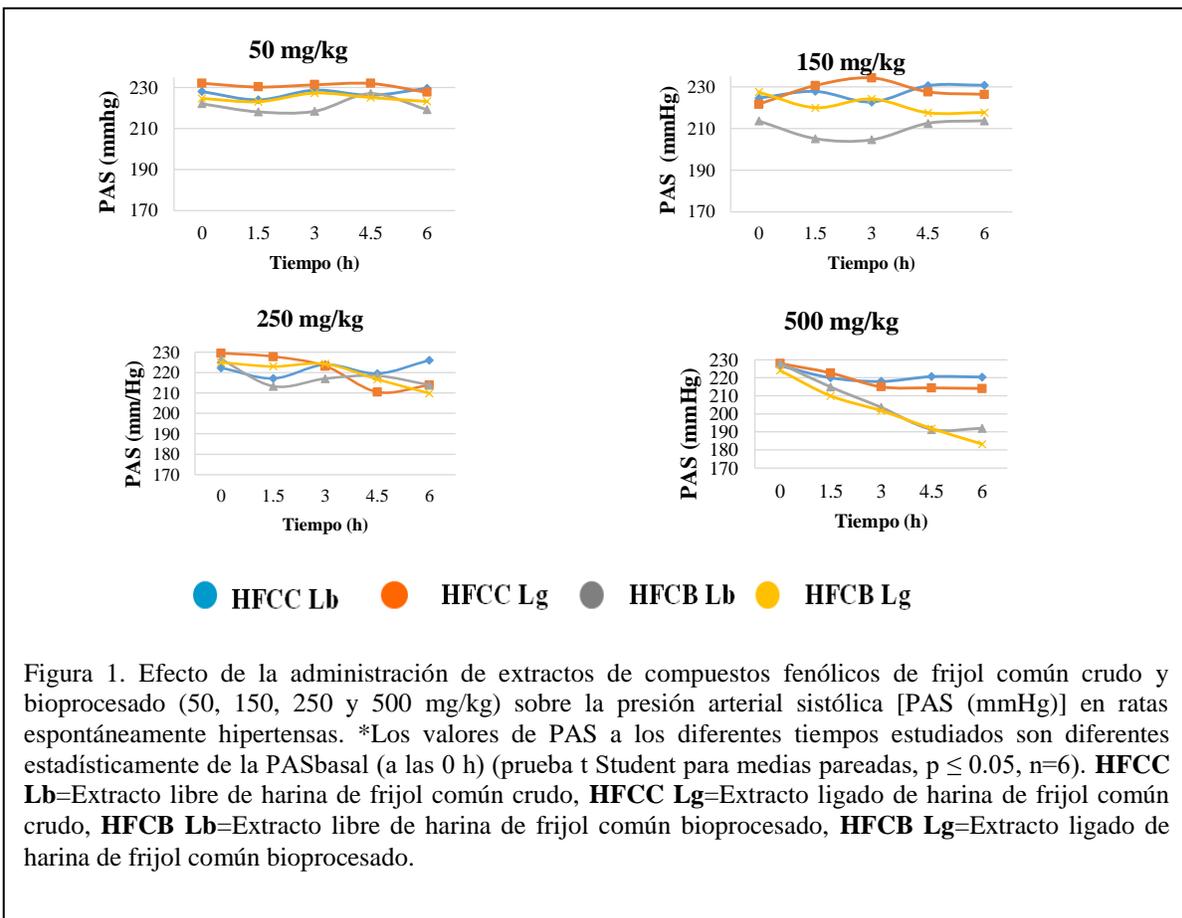
Análisis estadístico

Los resultados de Δ PAS de los diferentes tratamientos fueron analizados por medio de un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), seguido por comparación de medias aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan; además, se aplicó la prueba t Student para separación de medias de PAS de muestras pareadas entre los diferentes tiempos de estudio posteriores a la administración de cada tratamiento y el tiempo cero previo a la administración del mismo. Se usó un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la concentración de compuestos fenólicos con mayor efecto hipertensivo

Para comparar los valores de presión arterial sistólica (PAS) medidos a los diferentes tiempos posteriores a la administración de cada tratamiento con los valores de PAS al tiempo cero, previo a la administración de los mismos, se aplicó una prueba t Student para muestras pareadas. En la **figura 1**, se observan los valores de PAS obtenidos en cada tiempo de medición estudiado para cada una de las cuatro concentraciones de extractos fenólicos libres y ligados, de harinas de frijol crudo y frijol fermentado, que fueron administrados a las ratas SHR. En los extractos de fenólicos de frijol crudo, en la fracción libre (HFCC Lb), se observó una disminución significativa en la PAS a las 1.5 y 3 h después de la administración del tratamiento, y a partir de las 4.5 h comenzó a incrementar la PAS. En cuanto a la fracción de compuestos fenólicos ligados (HFCC Lg), éstos disminuyeron la PAS a partir de las 3 h de administrado el extracto, y ésta se mantuvo hasta las 6 h con una disminución de -13.84 mmHg. En el frijol bioprocesado por FES (tempe), se obtuvieron diferencias significativas a todas las horas de medición, tanto en su fracción de fenólicos libres (HFCB Lb), así como la fracción de fenólicos ligados (HFCB Lg), obteniendo una disminución de la PAS de -36.03 mmHg y -40.84 mmHg (porcentaje de disminución de la presión arterial (%DPAS) de 15.80% y 18.22%), respectivamente, a las 6 h de haber administrado el extracto fenólico. En las ratas tratadas con el control negativo no se presentaron disminuciones significativas de la PAS, mientras que las ratas tratadas con el control positivo (Captopril 10 mg/kg) presentaron disminuciones significativas de PAS a todos los tiempos estudiados, con una disminución de -35.54 mmHg a las 6 h de estudio. Se destaca la concentración de 500 mg/kg, en donde se observa un descenso notable de la PAS por parte de las fracciones libres y ligadas del extracto de tempe de frijol. Las fracciones libres y ligadas del frijol crudo también provocaron un descenso de la PAS, sin embargo, esta no fue tan considerable en comparación con el tempe de frijol. Es por ello que, la concentración de 500 mg/kg fue seleccionada como la concentración de compuestos fenólicos con mayor efecto hipertensivo.



Efecto de extractos de fenólicos (500 mg/kg) de harinas de frijol crudo y frijol fermentado sobre la capacidad antihipertensiva en ratas SHR

En el **cuadro I**, se describen las diferencias de presión sistólica [Δ PAS (mmHg)] en SHR a cada tiempo de medición respecto a las 0 h para cada uno de los tratamientos estudiados a una concentración de 500 mg/kg. Las disminuciones significativas de PAS fueron indicadas en el **cuadro I** con asterisco superíndice, y fueron determinadas con una prueba t Student para medias pareadas, como fue descrito en la sección anterior. Se observan diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos. También, se realizó un ANOVA seguido de una prueba de rangos múltiples de Duncan con un valor de $p < 0.05$, para separar las medias entre tratamientos que presentaron una disminución significativa de PAS y las cuales fueron identificadas con asterisco superíndice. Se destacan las fracciones de fenólicos libres y ligados del frijol bioprocesado, ya que obtuvieron mayores disminuciones de la PAS en comparación con el control positivo (Captopril) a las diferentes horas de medición, a excepción de las 6 h, en donde no se observaron diferencias significativas entre estos tres tratamientos. El captopril provocó un descenso significativo en PAS a partir de las 3 horas después de administrar el tratamiento hasta las 6 h de estudio, mientras que, los extractos de fenólicos libres y ligados de tempe de frijol causaron una disminución significativa de la PAS a partir de las 1.5 h después de la administración de los tratamientos hasta las 6 h de estudio.

Cuadro I. Efecto de la administración de extractos de compuestos fenólicos de harinas de frijol común crudo y bioprocesado (500 mg/kg) sobre la disminución de la presión arterial sistólica [Δ PAS (mmHg)] en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

t	HFCC Lb	HFCC Lg	HFCB Lb	HFCB Lg	Captopril	Control negativo
h	500 mg/kg	500 mg/kg	500 mg/kg	500 mg/kg	10 mg/kg	
1.5	-6.63 ^{a*}	-5.27	-13.06 ^{a*}	-14.09 ^{a*}	-8.25 ^{a*}	0.17 ^a
3	-8.64 ^{a*}	-12.94 ^{a,b*}	-24.36 ^{c*}	-22.34 ^{c*}	-7.82 ^{b*}	0.73 ^a
4.5	-5.99	-13.55 ^{a*}	-36.64 ^{b*}	-32.21 ^{b*}	-23.68 ^{a,b*}	-1.24 ^a
6	-6.23	-13.84 ^{a*}	-36.03 ^{b*}	-40.84 ^{b*}	-35.54 ^{b*}	2.07 ^a

*Los valores de PAS a los diferentes tiempos estudiados son diferentes estadísticamente de la PAS_{basal} (a las 0 h) (prueba t Student para medias pareadas, $p \leq 0.05$, $n=6$). ^{a,b,c,d} Las medias de Δ PAS en un mismo renglón con la misma letra no son diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$). **HFCC Lb**=extracto libre de harina de frijol común crudo, **HFCC Lg**=extracto ligado de harina de frijol común crudo, **HFCB Lb**=Extracto libre de harina de frijol común bioprocesado, **HFCB Lg**=Extracto ligado de harina de frijol común bioprocesado. El control negativo es agua desionizada (1mL/kg).

En el presente proyecto de investigación, se estudió el efecto de la FES sobre la propiedad antihipertensiva de extractos de fenólicos libres y ligados del frijol común Azufrado Higuera. Los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados de frijol fermentado (tempe) a una concentración de 500 mg/kg fueron los tratamientos que causaron las mayores disminuciones [-36.03 mmHg (-15.80%) y -40.84 mmHg (-18.22%), respectivamente] en los valores de la presión arterial sistólica (PAS) a los diferentes tiempos estudiados. La disminución de PAS en ratas hipertensas ocasionada por estos tratamientos no presentó diferencias significativas con el Captopril a las 6 h de estudio, sin embargo, en tiempos menores a 6 h (1.5, 3, 4.5 h), posteriores a la administración de los

tratamientos, los extractos de fenólicos libres y ligados de tempe de frijol (500 mg/kg) causaron una mayor disminución de PAS que las ratas tratadas con Captopril. González-Ramos (2011), administró un extracto fenólico de semilla de chí a una concentración de 400 mg/kg en ratas SHR, con un %DPAS del 16.7%, sin embargo, este

se observó hasta las 24 h después de haber administrado el tratamiento. Asimismo, Paredes-Carrera (2015) obtuvo una mezcla purificada de flavonoides a partir de cítricos (limón y toronja) y cacao, a una concentración de 100 mg/kg. Su mayor %DPAS se presentó hasta las 6 semanas posteriores a su administración, con un 24%. Estos resultados reflejan que, en la presente investigación, siendo el extracto fenólico una mezcla de diversos compuestos bioactivos como ácidos fenólicos y flavonoides, son comparables con los resultados de potencial antihipertensivo reportado en la literatura. Suzuki y col (2002), administraron ácido ferúlico puro a una concentración de 50 mg/kg en ratas SHR, obteniendo un %DPAS del 11% a las 6 h, así como también, en el 2006 administraron ácido clorogénico (300 mg/kg), obteniendo un 14% de disminución a las 9 h. Asimismo, Quiñones y col (2013), administraron una mezcla purificada de proantocianidinas (250 mg/kg) en donde se destacó la presencia de quercetina y kaempferol, y reportaron una disminución de la PAS de -31.77 mmHg a tan solo 2 h de haber administrado el tratamiento. Se ha reportado la presencia de ácidos fenólicos en el frijol común como el ácido ferúlico y clorogénico, además de flavonoides como el kaempferol, por lo que se puede relacionar el efecto antihipertensivo de los extractos fenólicos libres y ligados de esta leguminosa fermentada a la presencia de estos compuestos. De esta manera, también puede relacionarse a la FES como la responsable del incremento de estos compuestos y el consecuente aumento del potencial antihipertensivo, ya que el frijol crudo no demostró una disminución considerable de la PAS en comparación con el frijol bioprocesado. En conclusión, se puede decir que el proceso de FES mejoró significativamente la capacidad antihipertensiva en el frijol común Azufrado Higuera, y que el tempe de esta leguminosa representa una potencial alternativa natural para el control de la presión arterial en personas que sufren de este padecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Adom K.K., Liu R.H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(21):6182-6187.
- Crisan D., Carr J. 2000. Angiotensin I-converting enzyme. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2(3):105-115.
- Fritz M., Vecchi B., Rinaldi G., Añón M.C. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*. 126(3): 878-884.
- González-Ramos V. 2011. Efecto hipotensor e inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I de extractos de semillas de salvia hispánica L. in vitro e in vivo. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1):76-89.
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research* 68(1) 125-131.
- Rochín-Medina J.J., Gutiérrez-Dorado R., Sánchez-Magaña L.M., Milán-Carrillo J., Cuevas-Rodríguez E.O., Mora-Rochín S., Valdez-Ortiz A., Reyes-Moreno C. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International journal of food sciences and nutrition* 66(5):498-504.
- Romero-Martínez M., Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JÁ. 2013. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud pública de México* 55:S332-S340.
- Suzuki A., Kagawa D., Fujii A., Ochiai R., Tokimitsu I., Saito I. 2002. Short and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* 15(4): 351-357
- Suzuki A., Yamamoto N., Jokura H., Yamamoto M., Fujii A., Tokimitsu I., Saito I. 2006. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 24(6): 1065-1073.
- Torino M.I., Limón R.I., Martínez-Villaluenga C, Mäkinen S, Pihlanto A, Vidal-Valverde C, Frias J. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry* 136(2):1030-1037.