



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICOBIOLOGICAS

PROGRAMA EN MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS:

“La planta de frijol como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica y antioxidante y su variación por la inoculación con *Arthrobacter agilis* UMCV2”

Que presenta

QFB Sarahi López Mendoza

Como requisito para obtener el título de: Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de Tesis:

D.C Josué Altamirano Hernández

Morelia, Michoacán. México. Febrero 2017



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D.C. Josué Altamirano Hernández con el apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**

## DEDICATORIA

*A Dios: por darme la oportunidad de existir y darme la paciencia y fortaleza que fueron factores que me ayudaron a culminar con éxito este proceso de formación.*

*A mi familia: De una manera especial a mi esposo **Enrique Flores Torres** por su amor y apoyo brindado en todo momento, aún más en los momentos más difíciles en esta etapa de mi vida. A mi hija **Catherine Gisell**, por esos momentos en que una sonrisa templaba mi carácter y que sin saberlo con toda esa inocencia es el motor de mis días.*

*A mis padres: **Fernando López Cruz y Luisa Mendoza García**, por su apoyo, consejos invaluable y comprensión incondicional, estando presentes en los momentos más difíciles de mi vida y por haberme concedido el regalo más grande: “ la vida”.*

*A mis hermanos: **Neftali López Mendoza, Sonia López Mendoza** por creer en mí y darme siempre ánimos para salir adelante. De una manera muy especial a ese ángel que sé que me cuida y alumbra mi camino desde el cielo, **David López Mendoza***

*A mis suegros: **Zacarías Flores y Ana Torres**, Porque a pesar de la distancia siempre han estado presentes en todos los momentos importantes de nuestra vida.*

*A **David Flores**: Por su apoyo y tiempo dedicado en diversas actividades en esta etapa de mi formación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para realizar el presente estudio.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, por las facilidades otorgadas para que el presente proyecto se llevará a cabo.

Un especial agradecimiento al **D.C Josué Altamirano Hernández** por su apoyo, confianza y paciencia en mi trabajo de investigación, porque gracias a toda esa humildad que existe en su corazón ha podido ayudar a tantos estudiantes, se ha convertido en una persona con aportes importantes en mi formación como profesionista y también le agradezco por haberme facilitado los medios suficientes para terminar con éxito el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Agradezco a los integrantes de mi comité sinodal, los doctores en ciencias: **Lourdes I. Macías Rodríguez, Mauro Martínez Pacheco, Ernesto García Pineda y Víctor Meza Carmen** por su valioso tiempo dedicado en la revisión de la tesis y por sus importantes aportaciones para mi formación como profesionista.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada: **Marysol, Daniel, Abril, Sebastián, Tzitziqui, Aura, Jorge** les agradezco porque fueron compañeros generosos y dispuestos a ayudar como pocos, que compartieron conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor, por su tiempo y consejos durante el proceso de formación, así como las palabras de aliento.

Le agradezco a **Rosy** por la orientación en todos los trámites administrativos que hicieron más ameno el transcurrir del tiempo para cumplir con los requerimientos en el proceso de formación.

***Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología***

***(CONACyT). No de Becario 331548 (2014-2016).***

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
RESUMEN .....	II
ABSTRACT .....	III
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1 El frijol como alimento funcional.....	3
2.3 Relación del consumo de frijol en la prevención de enfermedades .....	3
2.4 El frijol en la medicina tradicional.....	5
2.5 Fitoquímica del frijol .....	7
2.5.1 Composición Química de la Semilla y Planta de Frijol.....	7
2.5.2. Los fenoles como metabolitos secundarios. ....	9
2.5.3. Influencia del estrés biótico en la concentración de fenoles. ....	11
2.6 Papel de los fenoles en la prevención de enfermedades.....	13
2.6.1 Actividad antioxidante.....	13
2.6.2. Actividad citotóxica .....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
5.1. Objetivo general.....	17
5.2. Objetivos particulares.....	17
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
6.1 Material biológico. ....	18
6.2 Crecimiento de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	18
6.3 Obtención de plantas de frijol.....	18
6.4 Extracción y cuantificación de fenoles. ....	18
6.5 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> . ....	18
6.5.1. Ensayo de DPPH.....	19
6.5.2. Ensayo de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP). ....	19
6.5.3 Ensayo de ABTS.....	19

6.6 Prueba de Citotoxicidad.....	20
6.6.1. Crecimiento de <i>Artemia salina</i> .....	20
6.6.2. Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT. .....	21
6.6.3. Determinación de DL <sub>50</sub> .....	21
6.7. Determinación del perfil de fenoles por HPLC. ....	22
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
7.1 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	24
7.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	27
7.2.1 Ensayo ABTS .....	27
7.2.2 Ensayo DPPH.....	29
7.2.3 Ensayo FRAP .....	32
7.3 ACTIVIDAD CITOTÓXICA.....	34
7.4 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES .....	36
7.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS POR HPLC.....	38
<b>8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>9.0 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>10. ADENDUM.....</b>	<b>50</b>
10.1. Actividad antimicrobiana .....	50
10.2 Determinación de actividad antimicrobiana.....	50
10.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	51
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO B. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO C. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO D. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRAP .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO E. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN TEJIDOS DE LOS CULTIVARES. ....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO F. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN EL CULTIVAR NEGRO QUERÉTARO .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO G. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN EL CULTIVAR FLOR DE JUNIO.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO H. CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LA MEZCLA DE ESTÁNDARES</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad biológica de los fitoquímicos presentes en el frijol. ....	5
Tabla 2. Composición Química de la tribu Phaseoleae a la cual pertenece la planta de frijol.....	9
Tabla 3. Efecto de la inoculación con PGPR en la producción de metabolitos secundarios en plantas medicinales.....	12
Tabla 4. Actividad Antioxidante de la Semilla de Frijol. ....	14
Tabla 5. Actividad citotóxica de los extractos metanólicos del cultivar Flor de Junio. ....	35
Tabla 6. Actividad citotóxica de los extractos metanólicos del cultivar Negro Querétaro. ....	35
Tabla 7. Perfil de compuestos identificados para el cultivar Flor de Junio. ....	39
Tabla 8. Perfil de compuestos identificados para el cultivar Negro Querétaro. ....	42
Tabla 9. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del cultivar Flor de Junio con las diferentes bacterias. ....	52
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del cultivar Negro Querétaro con las diferentes bacterias.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos. ....	8
Figura 2. <i>Artemia salina</i> en fase de larva estado V. ....	21
Figura 3. Concentraciones probadas para el cálculo de DL <sub>50</sub> . ....	23
Figura 4. Contenido de fenoles totales en las diferentes etapas analizadas en los cultivares Negro Querétaro y Flor de Junio. ....	25
Figura 5. Contenido de fenoles totales en etapa R6. ....	25
Figura 6. Contenido de fenoles de los tejidos en etapa R9. ....	26
Figura 7. Actividad antioxidante para el radical ABTS en la etapa R6 para ambos cultivares. ....	28
Figura 8. Actividad antioxidante con el radical ABTS. ....	29
Figura 9. Actividad antioxidante de los diferentes tejidos en etapa R6 para ambos cultivares de frijol.....	30
Figura 10. Actividad antioxidante para el radical DPPH en etapa R9.....	31
Figura 11. Actividad antioxidante FRAP en etapa R6. ....	32
Figura 12. Actividad antioxidante de los diferentes tejidos en etapa R9. ....	33
Figura 13. Análisis de componentes principales en el cultivar Flor de Junio.....	36
Figura 14. Análisis de componentes principales para el cultivar Negro Querétaro. ....	37
Figura 15. Estructura general de los flavonoides. ....	45

## RESUMEN

Se ha demostrado que el consumo de la semilla de frijol previene enfermedades crónico-degenerativas. Además existen reportes del empleo de raíces y hojas de frijol en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos. Se ha reportado a los compuestos fenólicos como los principales responsables del efecto benéfico del consumo del frijol, dado que los fenoles son un grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas bajo ciertas condiciones y con actividades específicas tales como la defensa contra patógenos, protección a la luz UV, establecimiento de simbiosis, entre otras funciones, la concentración de estos metabolitos puede verse afectada por el entorno en el que se desarrolle la planta y por las múltiples interacciones con los microorganismos provenientes de la rizósfera. Por otra parte se ha reportado que el contenido de fenoles no es el mismo en todos los tejidos de la planta ni en las diferentes etapas fenológicas.

Por lo tanto, dado que la planta de frijol ha sido reportada en la medicina tradicional nos planteamos evaluar el perfil de compuestos fenólicos y su actividad biológica en los diferentes tejidos y etapas fenológicas (V0, V3, R6, R8 y R9) para determinar si pudieran representar una fuente alternativa de metabolitos con mejores actividades biológicas comparados con la semilla y si *Arthrobacter agilis* UMCV2, una bacteria considerada PGPR, puede incrementar la concentración de compuestos fenólicos.

Se obtuvieron semillas de frijol Flor de Junio y Negro Querétaro, las cuales fueron sembradas en condiciones de invernadero. Se colectaron muestras de raíz, tallo, hoja, vaina y semilla en 5 etapas vegetativas diferentes. Se realizó la extracción metanólica de fenoles totales y su concentración se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se evaluó *in vitro* por 3 métodos diferentes: FRAP, ABTS y DPPH. Dado que el estrés oxidativo está relacionado con el desarrollo de algunos padecimientos crónicos tales como el cáncer se determinó la citotoxicidad de los extractos en *Artemia salina*. La actividad antimicrobiana se determinó por el método de antibiograma y el perfil de metabolitos por HPLC.

Los resultados indican que la mayor acumulación de fenoles ocurrió en las etapas R6 y R9 para ambos cultivares, dentro de estas etapas las hojas y las vainas mostraron la concentración de fenoles más alta y por lo tanto mejor actividad antioxidante comparado con la semilla, los cuales además se incrementaron por la presencia de *Arthrobacter agilis* UMCV2. Los extractos presentaron débil actividad antimicrobiana sin embargo destacaron por su potente actividad citotóxica.

**Palabras clave:** (Medicina tradicional, frijol, fenoles, antioxidante y citotóxico)

## ABSTRACT

The consumption of bean seeds has been shown to prevent chronic-degenerative diseases. There are also reports of the use of roots and leaves of bean in traditional medicine for the treatment of different diseases. Phenolic compounds have been reported as being the mainly responsible for the beneficial effect of bean consumption. Since phenols are a group of secondary metabolites produced by plants under certain conditions and with specific activities such as defense against pathogens, UV light, establishment of symbiosis, among other functions, the concentration of these metabolites can be affected by the environment in which the plant is developed and by the multiple interactions with the microorganisms coming from the rhizosphere. On the other hand it has been reported that the content of phenols is not the same in all tissues of the plant nor in the different phenological stages

Therefore, since the bean plant has been reported in traditional medicine, we decided to evaluate the profile of phenolic compounds and their biological activity in the different tissues and phenological stages (V0, V3, R6, R8 and R9) to determine if they could represent an alternative source of metabolites with better biological activities compared to the seed, and if *Arthrobacter agilis* UMCV2, a bacterium considered as PGPR, can increase the concentration of phenolic compounds.

Flor de Junio and Negro Querétaro bean seeds were obtained, and were sown under greenhouse conditions. Root, stem, leaf, pod and seed samples were collected in 5 different vegetative stages. The methanolic extraction of total phenols was performed and its concentration was determined by the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity was evaluated in vitro by 3 different methods: FRAP, ABTS and DPPH. Since oxidative stress is related to the development of some chronic conditions such as cancer, the cytotoxicity of extracts in *Artemia salina* was determined. The antimicrobial activity was determined by the antibiogram method and the metabolites profile was obtained by HPLC.

The results indicate that the highest accumulation of phenols occurred in stages R6 and R9 for both cultivars. In these stages the leaves and pods showed the highest phenol concentration and therefore better antioxidant activity compared to the seed, which were also increased by the presence of *Arthrobacter agilis* UMCV2. The extracts exhibited weak antimicrobial activity, but were notable for their potent cytotoxic activity.

**Keywords:** (Traditional Medicine, beans, phenols, antioxidant and cytotoxic)

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se ha demostrado que el consumo de la semilla frijol puede prevenir enfermedades crónico-degenerativas tales como el cáncer y la diabetes. Reynoso Camacho (2007) evaluó semillas de distintas variedades de frijol al incluirlas en la dieta de ratas inducidas a desarrollar cáncer de colón, obteniendo como resultado la reducción en el número de tumores.

Los estudios sobre las propiedades biológicas de los metabolitos del frijol hasta el momento solo se basan en la semilla, sin embargo el frijol era considerado como planta curativa dentro del conocimiento de la medicina tradicional encontrada en obras hechas por los indígenas tales como el Códice Florentino y el Códice de la Cruz-Badiano. En este sentido, existen reportes de la utilización de raíces como desparasitante e incluso para desinflamar los ojos. Las hojas y vainas secas se utilizaban en el tratamiento de enfermedades como la diabetes (Soriano-Bello 2006).

Diversos estudios señalan a los compuestos fenólicos como los responsables de prevenir las enfermedades antes mencionadas debido a que poseen actividad antioxidante, lo que resulta de gran interés ya que muchos trastornos de este tipo se relacionan ampliamente con el estrés oxidativo. Otra actividad biológica que se le ha atribuido a estos metabolitos es la de agentes antimicrobianos y citotóxicos.

Los fenoles son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran involucrados en la defensa contra radiación UV y patógenos, siendo este último su papel biológico principal (Pandey y Rizvi. 2009), sin embargo desempeñan otras funciones no menos importantes ya que contribuyen en el crecimiento y desarrollo de la planta tales como la pigmentación, atrayentes de polinizadores, pesticidas naturales y en el frijol al establecimiento de la simbiosis con el género *Rhizobium*. (Espinosa Alonso. 2006).

Dado que los fenoles son un grupo de metabolitos secundarios, su síntesis depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta; Dávila. *et al.* (2011) señalan que durante la germinación se producen diferentes cambios en la distribución de metabolitos secundarios; Díaz Batalla. *et al.* (2006) mencionan que el contenido de compuestos fenólicos es mayor en semillas germinadas que sin germinar. Los niveles constitutivos de fenoles solo incrementaran como una respuesta tanto al estrés abiótico como biótico (Sepúlveda Jiménez. *et al.* 2003). Este último tipo de estrés resulta de gran interés dada la diversa cantidad de microorganismos presentes en la rizósfera, los cuales también pueden repercutir en el perfil de estos metabolitos y en muchos de los casos mejorar la actividad biológica. Existen diversos estudios donde se han inoculado plantas medicinales con Bacterias Promotoras del Crecimiento o PGPR por sus siglas en inglés, y lo que se ha observado además de un aumento en la biomasa es un incremento en la concentración de metabolitos secundarios. La planta de frijol se ha inoculado con diferentes bacterias como *Bacillus subtilis* M496, *Rizhobium sp* y *Trichoderma*

*atroviride* para incrementar los compuestos fenólicos (González Rayo. 2014), sin embargo este estudio se analizó solo la semilla, por lo que resulta de suma importancia incrementar y determinar los compuestos fenólicos presentes en la planta de frijol en asociación con diferentes PGPR. *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una bacteria aislada de la rizósfera del maíz y la cual es considerada PGPR debido a la estimulación en el crecimiento de diversas plantas por lo que representa una alternativa para incrementar los compuestos fenólicos en la planta de frijol.

Actualmente ya no se le continúa dando el uso a la planta del frijol e incluso ya no es considerada como planta medicinal y por lo tanto resulta de gran interés retomar el estudio en sus diferentes etapas fenológicas (V0 germinación, V3 primera hoja trifoliada, R6 floración, R8 llenado de vainas y R9 maduración) así como en los diferentes tejidos para poder establecer su contenido en compuestos fenólicos y determinar si su capacidad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica pudiera ser mejor en algún otro tejido diferente a la semilla y si dichas actividades pueden mejorarse mediante la inoculación con PGPR como *Arthrobacter agilis* UMCV2.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 El frijol como alimento funcional.**

El frijol común *Phaseolus vulgaris* L. es una leguminosa y se encuentra dentro de los alimentos principales en la dieta humana, por lo que su producción se da en diversos ambientes de cosecha y en distintas regiones como lo son Latinoamérica, África, China, Europa y Estados Unidos. La producción promedio de frijol en 2013 fue de 22.5 millones de toneladas donde el principal productor fue Myanmar con un 16%, México ocupó el cuarto lugar con un 5.7% (FAO. 2015). Las principales variedades de frijol producidas en 2015 en México fueron el pinto con un 32%, seguido del frijol negro con un 27%, peruano 14%, Flor de Mayo 10%, Flor de Junio 8%, Bayo 4%, Canario 2% y otros, principalmente alubias, con un 3%. En México el frijol común es uno de los alimentos más importantes incluidos en la dieta, en áreas rurales el 15% de su alimentación es frijol y el 65% maíz, además se estima que el 57% de la población mexicana tiene el hábito de consumir frijol los 7 días de la semana, al menos una vez al día y el 74% lo consume cinco días de la semana. Por lo tanto el maíz y el frijol se convierten en la fuente principal de nutrientes para 25 millones de personas (Guzmán Maldonado. *et al.* 2002).

Considerando la importancia en la producción de frijol de nuestro país y dado que la mayoría de las personas lo incluyen en su dieta, podemos centrar la atención de los consumidores en los beneficios que aporta esta leguminosa a la salud.

El interés que se ha puesto en este alimento es debido a que en varios estudios su consumo se ha relacionado con la prevención o al control de enfermedades crónico degenerativas como lo son el cáncer, la diabetes y enfermedades cardiovasculares, esto por su alta riqueza en compuestos fenólicos, taninos, ácido fítico, inhibidores de tripsina, fibra y lectinas.

### **2.3 Relación del consumo de frijol en la prevención de enfermedades**

Existe evidencia de que en algunos países de América Latina con mayor consumo de frijol tienen menor incidencia a presentar cáncer de colón. Al respecto se han utilizado diversas variedades de frijol, Pinto Zapata, Flor de Mayo Anita, Flor de Junio Marcela (*Phaseolus vulgaris* L.) y Blanco Tlaxcala (*P. coccineus* L.), en forma de harina para alimentar a ratas inducidas a cáncer de colon, observando una disminución de cuatro veces en la aparición de tumores en comparación a las ratas que no se les incluyó frijol en su alimentación. Es importante resaltar que el consumo de frijol que se les dio a las ratas fue una concentración de 0.30 g por cada 99.7 g de croqueta, con lo cual se permitió que las ratas ingirieran lo

equivalente al consumo promedio anual de una persona. (Reynoso Camacho. *et al.* 2007).

Estudios epidemiológicos recientes, como en el Nurses' Health Study demuestran que existe una estrecha relación entre el consumo de lenteja y frijol con la disminución de sufrir cáncer de mama (Adebamowo. *et al.* 2005). La incidencia de cáncer de mama en mujeres hispanas que tienen una dieta nativa mexicana caracterizada por un alto consumo de frijol era dos tercios menor que el de la población caucásica no hispana, cuya alimentación está basada principalmente en carnes, azúcar y alimentos procesados (Murtaugh. *et al.* 2008). El frijol común es capaz de inhibir de manera significativa la etapa post-iniciación de la carcinogénesis mamaria inducida por químicos en ratas principalmente mediante la inducción de apoptosis (Thompson. *et al.* 2012).

El consumo de semilla cocida de frijol Pinto Durango y Negro 8025 a diferentes concentraciones durante 5 semanas se le ha relacionado con la disminución en los niveles de glucosa en ratas Wistar macho inducidas a diabetes con 45 y 55 mg/Kg de estreptozotocina, observando una disminución en los niveles de glucosa a partir de la primera semana de tratamiento el cual se mantuvo hasta la quinta semana, las ratas alimentadas con Pinto Durango mostraron una disminución de los niveles de glucosa en un 25% mientras que el Negro 8025 mostró un 28% de efecto hipoglucémico a diferencia del control. Por otra parte la dieta de las ratas basada en el consumo de la harina de semillas de frijol mostró una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos en un 50% para el Pinto Durango y hasta en un 78% para el frijol Negro 8025. La harina de frijol Negro 8025 presentó mayor concentración de fenoles totales, taninos condensados y antocianinas comparado con el Pinto Durango (Lomas Soria. 2008).

Por otra parte el consumo de frijol está asociado al control de la obesidad, al respecto dos cultivares fueron probados Flor de Junio FJB08058 y Flor de Mayo FMB0803, y si bien el frijol no mostró efectos preventivos sobre el incremento de peso corporal causado por la dieta hipercalórica administrada para la inducción de obesidad si previno la hipertrofia en los adipocitos así como la acumulación de triglicéridos en dichas células y mostró reducciones en parámetros relacionados con el desarrollo de la obesidad tales como alteraciones en el metabolismo de la glucosa, almacenamiento de grasa y daño oxidativo. La determinación de fitoquímicos mostró altas concentraciones de antocianinas, flavonoides y taninos condensados para ambos cultivares (De los Ríos Arellano. 2011). En otro estudio la dieta elaborada con el 50% de frijol Negro rico en polifenoles comparado con una semilla blanca, disminuyó los niveles de colesterol en un 41% y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un 28% (Alanís Guzmán. 2006).

La actividad biológica del frijol se le ha atribuido a diversos compuestos entre los que podemos citar la fibra, oligosacáridos, lectinas, inhibidores de proteasas, ácido fítico y polifenoles los cuales juegan un papel fundamental en la prevención de enfermedades ya que presentan diferentes mecanismos de acción, y pueden

actuar de diferente manera como: antioxidantes, antitumorales, moduladores enzimáticos, reductores del colesterol, promotores de la actividad intestinal y con efecto hormonal (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad biológica de los fitoquímicos presentes en el frijol (Slavin. et al. 1999).

Compuesto Bioactivo	Antioxidante	Antitumoral	Modulador enzimático	Reductor del Colesterol	Actividad intestinal	Efecto hormonal
Fibra			*	*	*	
Oligosacáridos			*	*	*	
Inhibidores de proteasas		*				
Ácido fitico	*	*		*		
Flavonoides/Isoflavonoides	*	*				
Ácidos Fenólicos	*	*				
Taninos	*	*				
Antocianinas	*	*				

## 2.4 El frijol en la medicina tradicional

Hasta el momento la importancia de las diferentes funciones del frijol en la prevención de diversas enfermedades han sido descritas en la semilla, sin embargo se sabe que otros tejidos de las plantas como las hojas y raíces, siempre han sido una fuente de metabolitos secundarios importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos (López Serrano y Cañellas García. 2012). La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de la población de países desarrollados utilizan drogas provenientes de las plantas, es decir se basan en la medicina tradicional para tratar problemas de salud. La farmacopea incluso contiene aproximadamente el 25% de medicamentos derivados de plantas, el resto son drogas sintéticas, sin embargo están basadas en compuestos prototipo aislados de las plantas (Sekar S. y Kandavel. 2010).

Actualmente la demanda de las plantas medicinales está en aumento tanto en países desarrollados como en desarrollo debido al enfoque que se le ha dado a los productos naturales, los cuales han sido principalmente la disminución de los efectos secundarios, la toxicidad y que el costo sea menor en comparación con productos sintéticos (Sekar S. y Kandavel. 2010). Lo anterior ha motivado el desarrollo de estrategias para la búsqueda y producción de nuevas plantas, que a diferencia de las alimenticias en donde lo importante es su rendimiento en kilos por hectárea, lo importante en las medicinales es una mayor concentración de sustancias activas que puedan ser útiles para el tratamiento de enfermedades (De la Rosa Mera. 2009).

El uso medicinal de las plantas que los rodeaban, llevó a los indo-americanos a cultivarlas y a acumular el conocimiento herbolario. Este conocimiento fue reconocido por los conquistadores como atestiguan obras escritas en el siglo XVI, tales como el Códice Badiano (De la Cruz, 1552) o de la Historia Plantarum Novae Hispaniae (de Francisco Hernández) en donde se describen principalmente las plantas prehispánicas de uso medicinal. Ahí está incluido el uso del frijol ayocote (*P. coccineus*), cuyo jugo se usaba para desinflamar los ojos y las raíces como purgante y desparasitador. El Códice Florentino (Fray Bernardino de Sahagún) repite el uso medicinal de la raíz de frijol ayocote ("cimatl") y advertía de la toxicidad de la raíz cruda (Soriano Bello. 2006).

El cultivo de frijol es la segunda actividad agrícola más importante en México, por ser una fuente indispensable de alimento en forma de semillas maduras y como vainas verdes o ejotes, además en algunos países de América Latina y África las hojas y flores tiernas son consumidas como vegetales frescos (Espinosa Alonso. 2006).

Diversas variedades de frijol han sido utilizados en la medicina tradicional, tal es el caso de *Phaseolus angularis* el cual es utilizado en Corea, China y Japón como tratamiento para infecciones y problemas como inflamación de articulaciones, apéndice, riñones y vejiga. Un estudio de extractos etanólicos de frijol *Phaseolus calcaratus* demostró su capacidad antiinflamatoria, ya que fue capaz de inhibir la producción de óxido nítrico y la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (Fang. *et al.* 2011). Tao Yu. *et al* (2011) determinan que el extracto etanólico de *Phaseolus angularis* posee efecto antiinflamatorio, ya que fue capaz de suprimir la producción de óxido nítrico y PGE2 a nivel transcripcional, los cuales actúan como mediadores de la inflamación, en modelos de ratones inducidos a gastritis.

*Phaseolus coccineus* es otra especie reportada en la medicina tradicional, la cual fue ampliamente utilizada como antiinflamatorio y antimicrobiano, además la raíz la utilizaron como purgante y desparasitante y las vainas secas en infusión para el tratamiento de la diabetes (Soriano Bello E. 2006).

Por otra parte el consumo de frijol se ha relacionado con el efecto protector ante el estrés oxidativo, un ejemplo de ello se llevó a cabo durante la administración oral de un extracto de vainas secas de *Phaseolus vulgaris* (200 mg/Kg de peso corporal) durante 45 días en ratas inducidas a diabetes mediante estreptozotocina, lo cual ocasionó una disminución en las sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos y un incremento en los niveles de glutatión reducido, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa en el hígado y riñones, además de la disminución de la glucosa a niveles comparables con un fármaco utilizado para el tratamiento de diabetes (Venkateswaran y Pari. 2002). La actividad antioxidante se ha determinado también en hojas de plantas de 26 días de 25 diferentes cultivares. Las

concentraciones de compuestos fenólicos fueron diferentes para cada cultivar lo cual se reflejó en la actividad antioxidante. El frijol Negro San Luis mostró mayor concentración de fenoles totales a diferencia de Flor de Junio Marcela, Negro Zacatecas y Pinto Durango, sin embargo en el cultivar Flor de Junio Marcela se encontró el mejor efecto antioxidante con una  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) muy cercana al compuesto puro quercitrina el cual fue utilizado como control positivo (Reyes-Martínez. *et al.* 2014).

## **2.5 Fitoquímica del frijol**

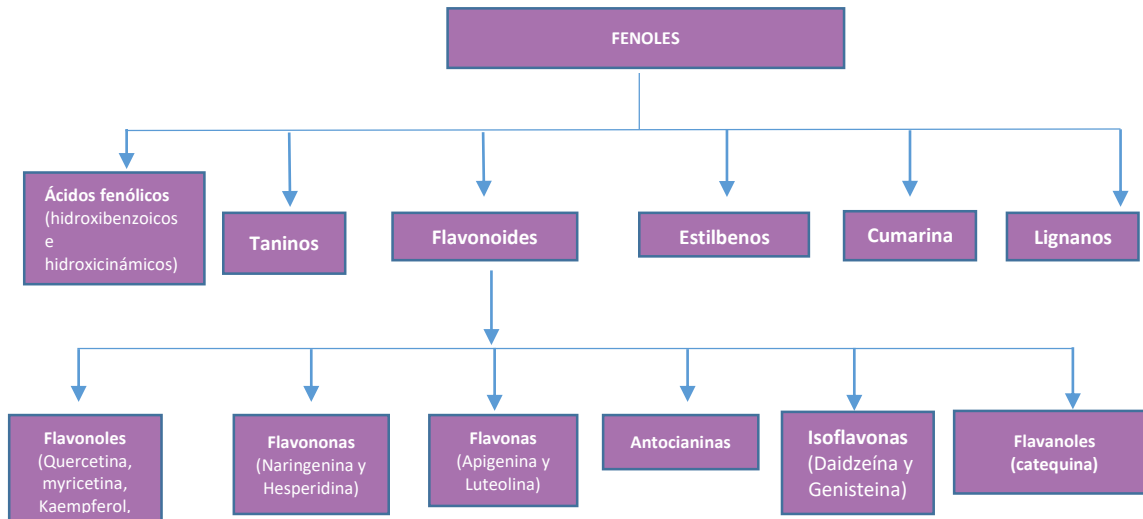
Se ha demostrado la gran capacidad de la semilla del frijol en la prevención del desarrollo de ciertas enfermedades y que incluso existen reportes del uso de la planta en la medicina tradicional. Por lo tanto resulta de suma importancia conocer la composición química de la semilla de frijol así como de la planta en sus diferentes etapas de desarrollo para saber que compuestos son los responsables de tales efectos.

### **2.5.1 Composición Química de la Semilla y Planta de Frijol.**

La composición química de la semilla del frijol es muy diversa ya que contiene fibra, proteínas, prebióticos, vitamina B y diversos micronutrientes (Cámara. *et al.* 2013). La semilla posee aminoácidos tales como lisina, fenilalanina y tirosina aunque es deficiente en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, sin embargo y a pesar de ello el porcentaje de proteína puede llegar hasta el 33% dependiendo de la variedad analizada, también aporta una cantidad importante de carbohidratos que dependiendo de la variedad de frijol van desde los 52 g a los 76 g por cada 100 g de semilla. Los lípidos aunque en fracción mínima también están dentro de la composición del frijol, estos los encontramos en un intervalo de 1.5 g a 6.2 g por cada 100 g de alimento, dentro de los cuales destacan los ácidos grasos mono y poliinsaturados, de la fibra presente la mitad puede llegar a ser soluble, encontrando como principales componentes químicos a las pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina y esta varía de 14-19 g/100 g. Además el frijol también es una fuente importante de calcio, hierro, magnesio y zinc y vitaminas como tiamina niacina y ácido fólico (Ulloa. *et al.* 2011).

Sin embargo en el frijol están presentes otros componentes, los cuales han sido reportados como los responsables de la actividad biológica de la semilla, entre ellos podemos citar a la fibra, el ácido fítico, los taninos, inhibidores de tripsina, lectinas y un grupo muy importante como los fenoles (Ulloa. *et al.* 2011). Los fenoles se definen como compuestos que posee un anillo aromático, el cual tiene uno o más sustituyentes hidroxilo (Charles Gerhardt. 1843), existen diversas clases de compuestos fenólicos, desde fenoles simples como los ácidos fenólicos hasta más complejos como los flavonoides, los cuales constituyen el grupo más amplio de este tipo de compuestos (Fig. 1).

Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos (Liu. 2004).



Se han determinado los principales fenoles presentes en la semilla de diversas variedades. En un estudio realizado en tres variedades de frijol consumido en EU (Pinto, Gran Norteño y Frijol Negro), se reportaron 16 diferentes ácidos fenólicos, el ácido ferúlico fue el más abundante, seguido por p-cumárico y sinápico. El contenido total de fenoles fue de 19.1– 48.3 mg/100 g de frijol. Los flavonoides se han descrito principalmente en semillas de color amarillo, café y negro (Espinosa Alonso. 2006).

Los ácidos fenólicos como el ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido gálico así como los flavonoides Kaempferol 3-O-glucósido y Kaempferol 3-O-acetilglucósido también han sido encontrados en semilla del frijol pinto, siendo el más abundante el ácido ferúlico con 18 mg/100g de frijol (Cámara. *et al.* 2013).

Por otra parte la planta de frijol muestra en su composición química a los flavonoides como los compuestos más abundantes comparados con otras clases químicas como los alcaloides y terpenoides (Tabla 2), incluso se ha demostrado que la raíz en particular exuda diversos compuestos entre los que se pueden incluir flavonoides, flavonas, flavononas, antocianinas e isoflavonoides (Oliveros-Bastidas. *et al.* 2009), los cuales específicamente en la planta de frijol son utilizados para establecer dialogo molecular con el género *Rhizobium*, estableciendo de esta manera una interacción para la formación de nódulos y la posterior fijación de nitrógeno (Quinto y Cárdenas. 2014).

Tabla 2. Composición Química de la tribu Phaseoleae a la cual pertenece la planta de frijol. (Bisby F. 1994).

Clases Químicas	Número de compuestos
Carbohidratos	21
Flavonoides	131
Taninos	-----
Lígnanos	2
Terpenoides	23
Esteroides	32
Aminoácidos y péptidos	97
Alcaloides	36

Los compuestos fenólicos en las plantas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios, los cuales tienen funciones específicas, hasta el momento no se ha determinado los tipos de compuestos fenólicos en la planta de frijol, por lo que resulta de gran interés dilucidar si son la misma clase de fenoles presentes en la semilla y si poseen las mismas actividades biológicas.

### 2.5.2. Los fenoles como metabolitos secundarios.

Los fenoles son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran involucrados en la defensa contra radiación UV y patógenos, siendo este último su papel principal (Pandey y Rizvi. 2009), sin embargo desempeñan otras funciones no menos importantes ya que contribuyen en el crecimiento y desarrollo de la planta tales como la pigmentación, atrayentes de polinizadores, pesticidas naturales y en el establecimiento de la simbiosis con el género *Rhizobium*. (Espinosa Alonso L.G. 2006).

Las plantas producen diversos metabolitos secundarios, en diferentes especies se han identificado alrededor de 8000 compuestos fenólicos. Todos los compuestos

fenólicos que derivan de las plantas tienen su origen en un intermediario común, la fenilalanina, vía la ruta del ácido Shikimico (Pandey y Rizvi. 2009).

La importancia de los metabolitos secundarios radica no solamente en el proceso de adaptación de la planta a su medio ambiente, como el establecimiento de simbiosis con los microorganismos, atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas, sino que la síntesis de estos compuestos es inducida cuando la planta se encuentra bajo ciertas condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda Jiménez G. *et al.* 2003).

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dado por modificaciones químicas a una estructura básica, provocada por reacciones químicas tales como hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación, lo que ocasiona perfiles metabólicos diferentes aún entre las mismas especies, los miembros de una población y los diferentes órganos de la planta, sin embargo esto último resulta como parte de la adaptación de las plantas. Las cantidades de fenoles encontrados en un estudio donde se utilizó frijol silvestre y enmalezado fueron mayores que en el frijol cultivado (Espinosa Alonso. 2006), lo cual establece que el contenido de fenoles puede también variar dependiendo de la especie de frijol y de las condiciones de cultivo.

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta y sus niveles constitutivos solo incrementaran como una respuesta tanto al estrés biótico como abiótico (Sepúlveda Jiménez. *et al.* 2003). Todos estos metabolitos incrementan bajo diferentes condiciones meteorológicas, en el caso de los fenoles, su concentración en la planta está influenciada por factores ecológicos como las radiaciones UV, estrés hídrico u ozono. El efecto de la radiación UV provoca sobre la planta una disminución de biomasa pero en respuesta a esto se incrementan las concentraciones de flavonoides. Por lo tanto es importante tomar en cuenta que dado que la concentración de los metabolitos secundarios en una especie depende de diferentes factores ecológicos como lo son cambios estacionales, temperatura, humedad, nivel de nutrientes y presión osmótica, estos pueden presentar también variación en diferentes partes de la planta. Otro factor importante a tomar en cuenta en la cuantificación de metabolitos secundarios en una especie es la edad de los individuos, ya que no resulta lo mismo una planta juvenil que otra madura puesto que las concentraciones pueden variar tanto cualitativamente como cuantitativamente (Valares Masa. 2011).

Un estudio realizado sobre la variación del metabolismo secundario de la jara pingosa (*Cistus ladanifer*) de la cual se obtenía el ládano para el tratamiento de la

tos, dolores reumáticos y como antiséptico, realizado por Valares Masa (2011) mostró una diferencia en cuanto a concentraciones de flavonoides tanto en hojas como en tallos de la planta, siendo mayor en las hojas jóvenes, además a estos resultados se les encontró variación en las diferentes estaciones del año, destacando con mayores concentraciones el verano, por último la variación de los metabolitos secundarios es dependiente de la edad de la planta; individuos con menos de un año de edad mostraron menor concentración que individuos con edades mayores, y además individuos mayores de 1 año y hasta los 6 años mantuvieron constantes sus concentraciones.

### **2.5.3. Influencia del estrés biótico en la concentración de fenoles.**

El estrés biótico en las plantas resulta de gran interés, ya que como se ha venido mencionando la síntesis de estos compuestos se encuentra involucrado en la defensa de la planta contra patógenos (hongos y bacterias), daños físicos por depredación de rumiantes, etc. (Vargas Ávila y Villamil Lozan. 2012). Sin embargo las raíces de las plantas se desarrollan en el suelo donde se encuentran en interacción constante con diversos microorganismos pertenecientes a la rizósfera. Algunas bacterias de la rizósfera pueden tener efectos positivos importantes en el desarrollo de plantas mejorando la fertilidad del suelo, la disponibilidad de nutrientes o influenciando el crecimiento de la raíz y follaje por la excreción de fitorreguladores como auxinas y citocininas. A las bacterias que tienen efectos positivos sobre el desarrollo de las plantas se les denomina Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR por sus siglas en inglés (Kloepper. 1978). Para este hecho es importante resaltar que para que estas interacciones se lleven a cabo es necesario un diálogo molecular, tal es el caso del frijol que excreta compuestos fenólicos con la finalidad de interactuar con su simbiote, un microorganismo del genero *Rhizobium* para obtener beneficios durante su desarrollo como la fijación de nitrógeno (Quinto y Cárdenas. 2014).

Las interacciones de los microorganismos con las plantas también se han utilizado para producir niveles deseados o mejorar las concentraciones de fitoquímicos sobre todo en plantas medicinales. Cuando se han inoculado plantas medicinales con PGPR se ha observado además de un aumento en la biomasa, un incremento en la concentración de metabolitos secundarios. Cuando se inoculó a *Origanum vulgare* L. con *Pseudomonas* sp. se obtuvo 10.2 mg/g de compuestos fenólicos mientras que en las plantas sin inocular se obtuvo 7.0 mg/g (Shetty. *et al.* 1995).

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de plantas medicinales inoculadas con PGPR con la finalidad de incrementar el contenido de metabolitos como la Ajmalicina, serpentina y Tanshinona útiles en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión (Sekar y Kandavel. 2010).

Tabla 3. Efecto de la inoculación con PGPR en la producción de metabolitos secundarios en plantas medicinales.

PLANTA	TRATAMIENTO	PGPR	METABOLITO INDUCIDO EN LA PLANTA	REFERENCIA
<i>Catharanthus roseus</i> (Vinca rosa)	Tratamiento de las plántulas por empapado del suelo.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ajmalicina	Jaleel <i>et al.</i> , 2007
<i>Catharanthus roseus</i> (Vinca rosa)	Tratamiento de las plántulas por empapado del suelo.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Serpentina	Jaleel <i>et al.</i> , 2009
<i>Hyoscyamus niger</i> (Beleño negro)	Cultivo de radícula para el crecimiento <i>in vitro</i> .	<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>P. putida</i>	Hiosciamina y escopolamina	Ghorbanpour <i>et al.</i> , 2010
<i>Crocus sativus</i> (Azafrán)	Remojo de cormos y empapado del suelo.	<i>Bacillus subtilis</i>	Picrocrocina, crocetina y compuestos safranales.	Eldin <i>et al.</i> , 2008
<i>Calendula officinalis</i> (Caléndula)	Cultivo en suspensión de células.	<i>Trichoderma viride</i>	Ácido aleanólico	Wiktorowska <i>et al.</i> , 2010
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (Sabia roja)	Cultivo de raíz	<i>Bacillus cereus</i>	Tanshinona	Zhao <i>et al.</i> , 2010

De la Rosa Mera (2009) aisló Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) a partir de 13 plantas medicinales, los cuales son caracterizados como microorganismos promotores del crecimiento de la planta y además están relacionados con la mejora en el suministro de nutrientes minerales, seleccionando solo aquellos que presentaron porcentajes de colonización superiores al 40% en *Catharanthus roseus* (L.), una planta medicinal útil en el tratamiento de ciertos de tipo de cáncer debido al contenido de alcaloides vinblastina y vincristina. Después de 75 días, la inoculación con HMA en *C. roseus* incremento significativamente la concentración de vinblastina y vincristina, así como la actividad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos.

La planta de frijol se ha inoculado con diferentes bacterias como *Bacillus subtilis* M496, *Rizhobium sp* y *Trichoderma atroviride* para incrementar los compuestos fenólicos, en este estudio en particular el incremento de compuestos fenólicos se logró solo con *Trichoderma atroviride*, las plantas que se inocularon con *Bacillus subtilis* M496 y *Rizhobium sp* no presentaron diferencias significativas respecto al control (González Rayo. 2014), sin embargo este estudio se enfocó al análisis de la semilla, por lo que resulta de suma importancia incrementar y determinar los compuestos fenólicos presentes en la planta de frijol en asociación con diferentes PGPR. Recientemente se han aislado bacterias de diferentes ambientes como *Arthrobacter agilis* UMCV2 la cual fue aislada de la rizósfera del maíz (Valencia Cantero. *et al.* 2007), la cual ha demostrado promover el crecimiento por mecanismos diferentes en plantas como *Pinus devoniana* (Montejano Mayo. *et al.* 2016), *Arabidopsis thaliana* (García Juárez. *et al.* 2010), *Medicago truncatula*

(Orozco Mosqueda. *et al.* 2013) y *Phaseolus vulgaris* (Valencia Cantero. *et al.* 2007), sin embargo no existe evidencia de la interacción *Arthrobacter agilis* UMCV2- *Phaseolus vulgaris* sobre la acumulación de metabolitos secundarios en la planta.

## **2.6 Papel de los fenoles en la prevención de enfermedades**

El interés de incrementar los metabolitos secundarios en las plantas se ha venido dando cada vez con más frecuencia debido a que resultan útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades. En el caso del frijol se ha reportado ampliamente a los fenoles como los principales metabolitos responsables de los efectos benéficos destacando principalmente como poderosos antioxidantes, citotóxicos y antimicrobianos. La actividad antimicrobiana se origina por la síntesis incrementada de estos compuestos como mecanismo de defensa durante la agresión hacia las plantas por microorganismos patógenos mientras que el comportamiento antioxidante de los fenoles está relacionada con la presencia de grupos hidroxilo en las moléculas.

### **2.6.1 Actividad antioxidante.**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen de forma natural por el organismo durante las reacciones que conllevan a generar energía, situación que no es alarmante ya que el propio organismo tiene la capacidad de responder por diversos mecanismos y reducir el riesgo de daño. Sin embargo cuando el balance entre las ROS y los mecanismos para contrarrestarlas no está en equilibrio comienzan a surgir daño en moléculas importantes tales como lípidos, proteínas y ADN que pueden conducir a una variedad de enfermedades crónico-degenerativas tales como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, Alzheimer entre otras. (Cámara. *et al.* 2013).

En los últimos años se ha incrementado la concentración de especies reactivas de oxígeno en el humano debido a diversos factores entre ellos la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos o el humo de tabaco (Avello y Suwalsky. 2006).

Los fenoles tienen efecto protector contra el daño oxidativo celular causado por la inflamación, infecciones microbianas, hábitos dietéticos entre otros, por diversos mecanismos tales como atrapar los radicales libres, la inhibición o la activación de enzimas rédox o como quelantes de metales. Dichos compuestos son menos potentes que las drogas farmacéuticas, sin embargo ejercen su efecto a largo plazo ya que se encuentran en una diversidad de alimentos entre ellos el frijol y con menos efectos secundarios. (Cámara. *et al.* 2013).

Los flavonoides son una clase de fenoles, los cuales tienen la capacidad de bloquear la acción deletérea de los radicales libres sobre las células, retirando el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, y la peroxidación de los glóbulos rojos. De hecho, estadísticamente se ha demostrado una estrecha relación entre poblaciones menos propensas a padecer afecciones cardiovasculares con un alto consumo de flavonoides. Se ha comprobado que la administración profiláctica de flavonoides disminuye la producción de radicales libres en la reperfusión después del bypass en cirugía de reemplazamiento vascular. El flavonoide quercetina ha demostrado efectos sinérgicos con la vitamina C además de prevenir la peroxidación lipídica, atenuar los depósitos de colágeno y el proceso de fibrogénesis hepática en ratas con obstrucción biliar en las que se produce estrés oxidativo y una reducción de las defensas antioxidantes. La quercetina y kaempferol son importantes para la concentración intracelular de glutatión, ya que son capaces de aumentar su nivel hasta en un 50%, induciendo así el sistema antioxidante y de esta manera la prevención de enfermedades relacionadas con un estrés oxidativo, tales como algunos tipos de cáncer (Martínez Flórez S. *et al.* 2002).

En el tabla 4 se ilustra la participación en la actividad antioxidante de la semilla del frijol en diferentes modelos de estudio (Cámara. *et al.* 2013)

Tabla 4. Actividad Antioxidante de la Semilla de Frijol.

Desorden-Enfermedad	Modelo	Tratamiento	Resultados principales	Referencia
Estrés oxidativo e inflamación	<i>In vitro</i> (ORAC, COX and 150 LOX kits)	Extractos de la testa de frijol pinto.	Extractos de frijoles pintos muestran capacidad antioxidante. Los frijoles pintos y negros poseen efectos inhibitorios en COX-1 y COX-2.	Oomah <i>et al.</i> 2010
Estrés oxidativo y resorción ósea	Ratones machos de 12 meses de la cepa C57BL/6	Extracto de la testa de frijol	Los extractos mostraron alta actividad antioxidante y disminución de la concentración sérica de un marcador de la resorción ósea.	Cao <i>et al.</i> 2010
Estrés oxidativo y proliferación de células cancerosas	Células de adenocarcinoma gástrico humano y 9 líneas celulares (Ensayos de antiproliferación)	Extractos fenólicos de semillas maduras de 13 leguminosas incluido el frijol	Los frijoles, las lentejas mostraron efectos inhibitorios dosis-dependientes en la proliferación celular y todas las líneas de células cancerosas.	Xu & Chang. 2012

### 2.6.2. Actividad citotóxica

Las especies reactivas de oxígeno se encuentran involucradas en el desarrollo y/o complicaciones de diversas enfermedades, entre las que podemos citar el cáncer, el cual es una de las principales causas de mortalidad, en el 2012 se calcularon 8.2 millones de muertes y se prevé que el número de casos aumente un 70% los próximos 20 años (OMS, 2015). Se ha demostrado que el aumento en el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos reduce el riesgo de desarrollar cáncer (Scalbert. *et al.* 2005). Las plantas son una fuente importante de metabolitos, entre ellos los compuestos fenólicos, los cuales pueden ser empleados en el tratamiento y/o prevención de cáncer. Muchos estudios se llevan a cabo para determinar el potencial citotóxico de los compuestos bioactivos de plantas debido a que van a ser utilizados como fármacos o cosméticos, los cuales no deben mostrar citotoxicidad o van a ser empleados como agentes anticáncer y donde la citotoxicidad es crucial para poder ejercer efecto (Freshney. 2002).

Los compuestos fenólicos provenientes de la semilla de frijol han demostrado tener efecto antiproliferativo y citotóxico. López A. *et al.* (2013) determinaron el efecto citotóxico de la semilla cruda y germinada de frijol Negro cultivar Tolosana contra tres líneas celulares cancerosas renal (TK-10), de mama (MCF-7) y melanoma (UACC-62). Los extractos mostraron diferente actividad sobre las líneas celulares de manera dependiente de la concentración, la semilla cruda mostró mayor citotoxicidad contra la línea TK-10, el germinado por otra parte, mostró efecto citotóxico contra MCF-7 y UACC-62, efecto que es atribuido al perfil de los extractos, ya que presentaron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos de semillas y germinado de frijol Negro San Luis también fueron capaces de inhibir la proliferación celular de cáncer de mama (MCF-7), hígado (HepG2), colón (Caco2) y próstata (PC3). Tanto la semilla como el germinado mostraron especificidad hacia las líneas celulares cancerosas a diferencia de las células utilizadas como control, fibroblastos (NIH3T3). La semilla mostró mayor porcentaje de inhibición hacia las células HepG2 y Caco2 mientras que el germinado tuvo efecto en todas las líneas celulares probadas (Guajardo-Flores. *et al.* 2013).

Actualmente la planta de frijol ya no se utiliza en la medicina tradicional, además la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de los fenoles provenientes de las diferentes partes de la planta no se ha probado, por lo que resulta interesante determinar si estos compuestos presentan una fuente alterna a la semilla, la cual es más destinada para el consumo, de extracción de metabolitos y si su actividad biológica puede verse mejorada con la inoculación de PGPR.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La semilla de frijol es rica en compuestos fenólicos los cuales poseen actividad biológica. La composición química de la planta de frijol muestra altos niveles de compuestos fenólicos y se ha reportado el uso de la planta en la medicina tradicional. México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en producción de frijol, sin embargo actualmente ya no se le da ningún uso a la parte vegetativa por lo que representa una fuente alterna más accesible y económica de metabolitos secundarios para el tratamiento de diversas enfermedades, los cuales además pueden modificarse mediante la inoculación con *Arthrobacter agilis* UMCV2.

## **4. HIPÓTESIS**

La planta de frijol posee mayor concentración de compuestos fenólicos y mejor actividad biológica y antioxidante comparados con la semilla, los cuales incrementan con la inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general.**

- Analizar el contenido de compuestos fenólicos, su actividad biológica y antioxidante de la planta de frijol y la semilla, y su variación por efecto de la inoculación con *Arthrobacter agilis* UMCV2.

### **5.2. Objetivos particulares.**

- Determinar la concentración de fenoles en la planta y semilla de frijol.
- Evaluar la actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica de la planta y semilla de frijol.
- Analizar si *Arthrobacter agilis* UMCV2 modifica la concentración de compuestos fenólicos y la actividad biológica y antioxidante.
- Evaluar el perfil de compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de la planta de frijol.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Material biológico.

La cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2 utilizada en el presente estudio pertenece a la colección de rizobacterias del laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas a cargo del Dr. Eduardo Valencia Cantero.

Las semillas de frijol Flor de Junio y Negro Querétaro se obtuvieron en un mercado en la ciudad de Morelia Michoacán. Los cultivares de frijol, antes mencionados, son los más consumidos y además existen reportes de la relación del consumo de las semillas con la prevención de enfermedades tales como el cáncer de colón (Reynoso Camacho. *et al.* 2007) y diabetes (Lomas Soria. 2008).

**6.2 Crecimiento de *Arthrobacter agilis* UMCV2.** La bacteria se creció en medio PY con agitación constante por 72 h a temperatura ambiente.

**6.3 Obtención de plantas de frijol.** Se seleccionaron las semillas que se encontraron en óptimas condiciones para desinfectarlas con alcohol al 70% y cloro al 10%, una vez desinfectadas se procedió a inocularlas sumergiéndolas en medio PY conteniendo la bacteria *A. agilis* UMCV2 (aprox.  $3.5 \times 10^8$  células/mL) por 10 minutos para posteriormente colocarlas en macetas con suelo previamente esterilizado. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en condiciones de invernadero, se realizaron dos aplicaciones más del inoculante en dos diferentes etapas, aparición de la primera hoja trifoliada y en floración. La colecta de plantas se realizó en 5 etapas diferentes, germinación (V0), primera hoja trifoliada (V3), floración (R6), llenado de vainas (R8) y maduración (R9). Las muestras se separaron en raíz, hojas, tallo, vainas y semillas.

**6.4 Extracción y cuantificación de fenoles.** Para la extracción de fenoles totales se colocó la muestra de los diferentes tejidos vegetales en una solución de metanol al 50% adicionado con HCl al 1% con agitación constante por 3 días consecutivos con un cambio de solución cada 24 h. Las muestras se filtraron con papel filtro Whatman de tamaño del poro de 11  $\mu$ m. La muestra se concentró en rotavapor hasta sequedad a una temperatura de 50°C para recuperarla en 3 mL de metanol al 50%. La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. El ácido gálico se empleó como estándar a una concentración de 0.010 a 5 mg/mL. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro M491 EPOCH. La concentración de fenoles totales se reportó como mg de equivalentes de ácido gálico.

**6.5 Determinación de la actividad antioxidante in vitro.** Para determinar la actividad antioxidante los extractos se normalizaron a una concentración de 10

µg/mL esto con el fin de evaluar la potencia antioxidante de los extractos en cada tejido, para ello se utilizaron 3 métodos diferentes.

**6.5.1. Ensayo de DPPH.** La molécula 2,2- difenil-1-picrilhidrazil es caracterizada como un radical libre debido a la deslocalización de un par de electrones en su estructura. El color característico de esta molécula es violeta, al entrar en contacto con algún compuesto que sea capaz de donar un electrón para estabilizarla, el color se torna amarillo (Alam. *et al.* 2013). Para éste ensayo se preparó una solución conteniendo el radical DPPH a una concentración 0.1 mM en metanol al 80%. Se colocaron 10 µL de muestra y 140 µL de la solución en placas de 96 pocillos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 517 nm. El trolox se utilizó para la curva patrón a concentraciones de 12.5 a 800 µM.

**6.5.2. Ensayo de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).** Este método mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro. El fundamento está basado en la reducción del complejo hierro férrico y la molécula 2, 4, 6-Tripiridil-S-Triazina (TPTZ) a la forma ferrosa a pH ácido. Esta reducción puede ser medida por el cambio en la absorción a 593 nm en espectrofotómetro (Alam. *et al.* 2013). La solución de trabajo se preparó, con acetato de sodio 300 mM a pH de 3.6, cloruro férrico 20 mM y el TPTZ 10 mM (10:1:1 v/v), dicha solución se calentó a 37°C durante 10 minutos y con agitación constante protegido de la luz. La determinación de la actividad de los extractos se realizó en placas de 96 pocillos donde se colocaron 10 µL de muestra y 150 µL de la solución de trabajo, esta reacción se dejó 20 minutos protegida de la luz. La lectura se realizó en espectrofotómetro a 593 nm. El trolox se utilizó para la curva patrón a concentraciones de 12.5 a 800 µM.

**6.5.3 Ensayo de ABTS.** La técnica se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical Ácido 2-2-Azino-bis 3 etilenbenzotiazonilo-6 sulfónico (ABTS), debido a la interacción con especies donantes de protones o de electrones (Alam. *et al.* 2013). La solución de trabajo se preparó con cantidades iguales del radical ABTS y persulfato de potasio 2.6 mM en agitación constante y protegidos de la luz por 1h 30 minutos, transcurrido ese tiempo se realizaron diluciones volumen/volumen con metanol hasta que se obtuvo una absorbancia de 0.7- 0.8 a una longitud de onda de 739 nm.

La actividad de los extractos se determinó con 10 µL de muestra y 190 µL de solución de trabajo en placas de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 739 nm. El trolox se utilizó para la curva patrón a concentraciones de 12.5 a 800 µM.

**6.6 Prueba de Citotoxicidad.** Los ensayos de citotoxicidad regularmente son costosos, requieren disciplina, equipo sofisticado, recolección de sangre y personal de tiempo completo, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos que sean igual de sensibles pero que disminuyan los costos, el tiempo y la cantidad de muestra utilizada. El ensayo de letalidad en *Artemias* también conocido como BSLT por sus siglas en inglés (Brine Shrimp Lethality Test) resulta una opción a esto. Este método es ampliamente utilizado para la detección de compuestos bioactivos en extractos crudos de plantas, aunque también se le ha empleado para determinar la toxicidad de algunos extractos de plantas, determinación de metales pesados, pesticidas, aditivos para comidas y algunas drogas. BSLT ha incrementado su uso debido a los bajos costos, alta sensibilidad para la detección de compuestos citotóxicos y el uso de cantidades menores de muestras comparado con otros métodos, además de que las larvas de *Artemias* que se emplean para este ensayo son muy similares con una célula de mamífero, es rápido, simple y barato, por el uso de pequeñas cantidades de material para cada prueba (Mirzaei. *et al.* 2013).

**6.6.1. Crecimiento de *Artemia salina*.** Los quistes de *Artemia salina* se colocaron en agua salada (3% de sal san-Halita, especial para acuarios), a una temperatura de 25°C con una iluminación de aproximadamente 2000 lux en la superficie del agua y manteniendo una aireación constante que permitió mantener niveles de oxígeno por encima de 2 mg/L (Sorgeloos. *et al.* 1986). Después de 72 h las *Artemias* se encontraron en la fase de larva estado V (Fig. 2), las cuales eran utilizadas para las pruebas.

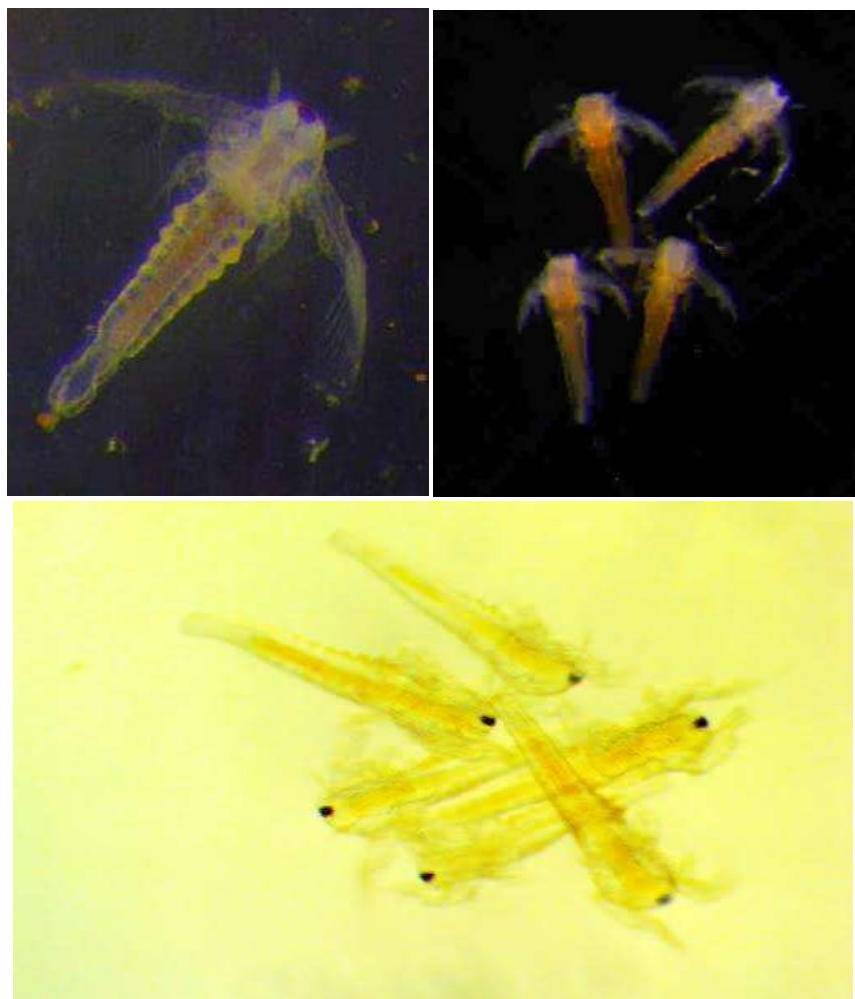


Figura 2. *Artemia salina* en fase de larva estado V. Fotografías tomadas con microscopio compuesto Leica Mod. M80.

#### **6.6.2. Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT.**

El intervalo de concentraciones adecuadas de los extractos metanólicos para realizar el BSLT se determinó en un intervalo de concentración de 2-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los mejores resultados se obtuvieron a concentraciones de 2-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en tiempos relativamente cortos (Fig. 3).

**6.6.3. Determinación de  $\text{DL}_{50}$ .** La dosis letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) se determinó con las *Artemias* en fase de larva estado V. Las larvas se colocaron en placas de 96 pocillos, 6 larvas por pozo, para cada extracto se utilizaron cuatro concentraciones en un intervalo de 2-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El agua salada absoluta y otro con un volumen de metanol 50% equivalente a la concentración máxima del extracto a evaluar se emplearon como controles, con la finalidad de descartar que el metanol tuviera un

efecto sobre el cálculo de la  $DL_{50}$ . La muerte de las larvas se determinó cada 10 minutos por un período máximo de 90 minutos. La  $DL_{50}$  se calculó por el método de regresión lineal seleccionando aquella  $R^2$  con valores mayores o iguales a 0.8 (Fig. 3) y que presentará el 100% de sobrevivencia para las concentraciones más bajas y el 0% de sobrevivencia para aquellas concentraciones más altas.

**6.7. Determinación del perfil de fenoles por HPLC.** Las muestras con mejor actividad antioxidante y actividad citotóxica se utilizaron para analizar el perfil de fenoles presentes por HPLC. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Líquidos (Agilent Serie 1200) equipado con una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 y un detector UV de longitud de onda múltiple. La identificación de compuestos se realizó por medio de una mezcla de estándares externos elaborada con los ácidos fenólicos: gálico, quínico, transcinámico, hidroxibenzoico, clorogénico, cafeico, dihidroxibenzoico, p-cumárico, rosmarínico y ferúlico. Las muestras se inyectaron en un loop de 20  $\mu$ l. Los solventes utilizados fueron agua acidificada 0.1% ácido ortofosfórico (A) y metanol 50% adicionado con 0.1% ácido ortofosfórico (B). El método utilizado fue: 80% A, 20 % B del min 0 al min 15; 87.5% A, 12.5 B del min 15 al 15.1; 100 A del min 15.1 al min 22; 20% A, 80 B del min 22 al min 32; 100% B del min 32 al min 34; 80% A, 20% B del min 34 al min 40. El flujo fue de 0.8 mL/min. Los compuestos se determinaron a las longitudes de onda de 250 nm, 280 nm y 320 nm para fenoles y de 250 nm, 280 nm, 320, nm y 359 nm para flavonoides.

**6.8 Análisis Estadístico.** El análisis estadístico de los diferentes ensayos se realizó con el programa STATISTIC 8.0 mediante un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y una prueba de medias Tukey considerando  $p < 0.05$  como probabilidad mínima aceptable para las diferencias entre medias y un análisis de componentes principales.

### Sobrevivencia de *Artemia salina*

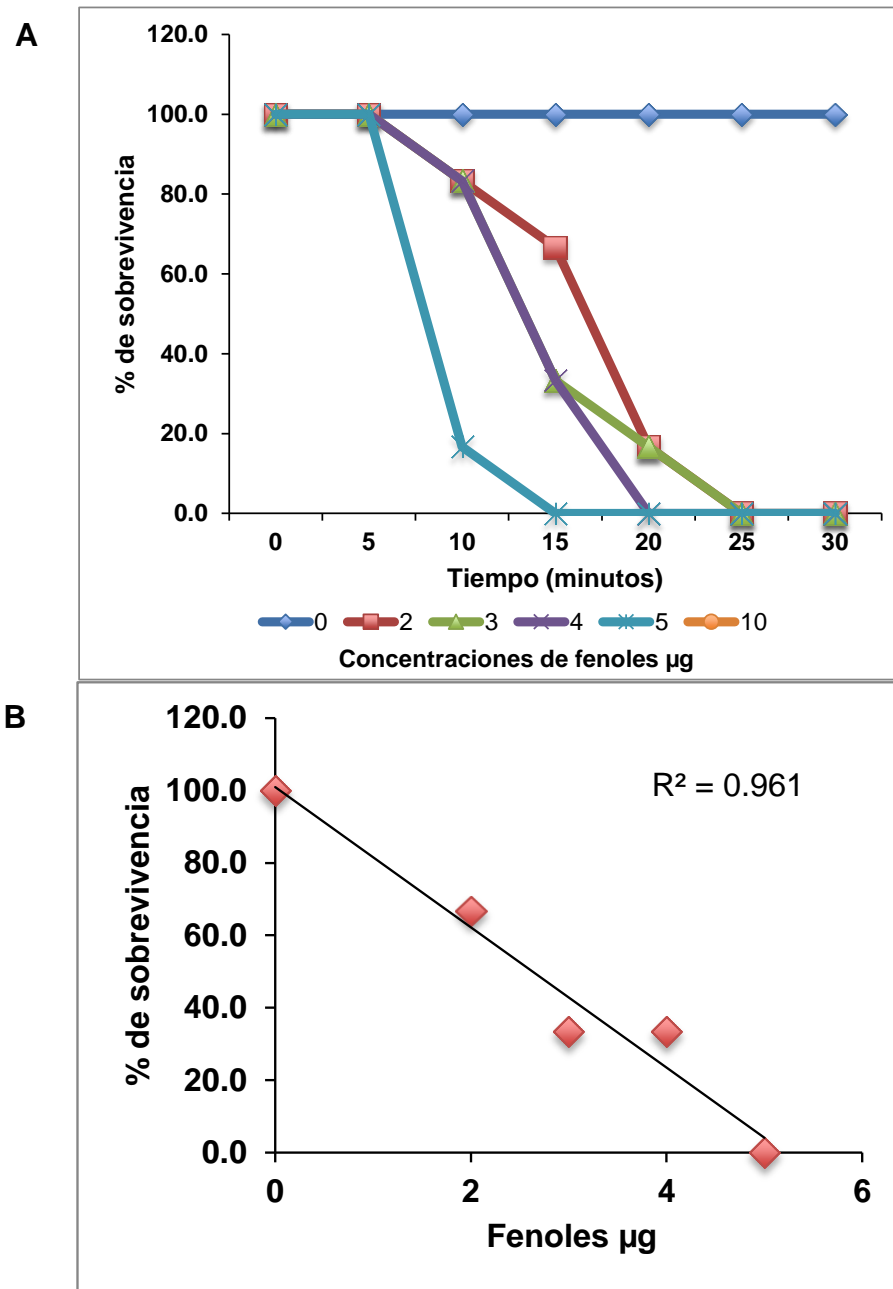


Figura 3. Concentraciones probadas para el cálculo de  $DL_{50}$ . Panel A. Gráfico de las concentraciones de fenoles empleadas en el ensayo, la mejor respuesta se obtuvo en un rango de 2-5 µg/mL. Panel B. Regresión lineal a los 15 minutos, en el cual se ilustra el procedimiento realizado para el cálculo de  $CL_{50}$  en base al mejor valor de  $R^2$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

La concentración de fenoles totales en la semilla es diferente para cada cultivar, en el cultivar Negro Querétaro se obtuvieron 4.0 mg EAG/g mientras que para el cultivar Flor de Junio 3.0 mg EAG/g, de igual manera se encontraron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos para cada etapa analizada en ambos cultivares. Las etapas V0, V3, R6 y R8 poseen menor concentración de fenoles en comparación a la semilla en el cultivar Negro Querétaro. En el cultivar Flor de Junio las etapas V0, V3, y R8 presentan menor contenido de fenoles a diferencia de la semilla (Fig. 4).

La concentración de fenoles en el germinado (V0) es inferior al encontrado en la semilla en ambos cultivares. Los tejidos como la raíz y el tallo en la primera hoja trifoliada (V3) y llenado de vainas (R8) presentan concentraciones inferiores al de la semilla. Las hojas de la etapa V3 del cultivar Flor de Junio tienen una concentración de fenoles de 1.50 mg EAG/g concentración que es menor en comparación con la concentración de la semilla. Sin embargo en presencia del inoculante igualan la concentración de la semilla debido a un incremento de 1.20 mg EAG/g. El tallo del cultivar Negro Querétaro presenta un incremento de compuestos fenólicos del 50% en presencia del inoculante. La concentración de compuestos fenólicos en las hojas del cultivar Negro Querétaro en la etapa R8 es estadísticamente igual a la semilla e incrementa en presencia del inoculante. Las vainas y las raíces en etapa R8 presentan menor concentración de fenoles en comparación con las semillas (Anexo A). Las etapas R6 y R9 de ambos cultivares representan una alternativa a la semilla y además incrementan la concentración de compuestos fenólicos con la presencia del inoculante (Fig. 4).

El contenido de fenoles para cada tejido presenta diferencias en cada etapa analizada. En la etapa R6 para ambos cultivares se observa que la raíz es el tejido con menor concentración de fenoles, seguido del tallo y finalmente las hojas. Las hojas del cultivar Flor de Junio en esta etapa son estadísticamente igual a la semilla. Con el sistema de inoculación la raíz y el tallo no presentan modificaciones. Sin embargo las hojas del cultivar Negro Querétaro incrementan la concentración de fenoles de 2.6 a 6.0 mg EAG/g, es decir el incremento es de más del 50%, concentración que es mayor en comparación con las semillas (Fig. 5).

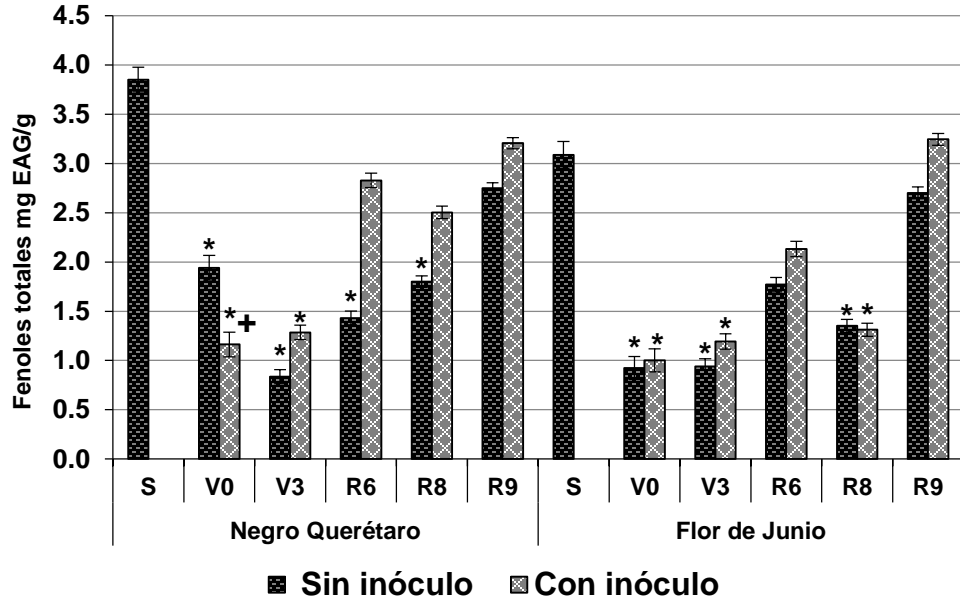


Figura 4. Contenido de fenoles totales en las diferentes etapas analizadas en los cultivares Negro Querétaro y Flor de Junio. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=8$ ; barra= SD. \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla. + denota diferencias significativas entre etapas respecto al inóculo por cultivar.

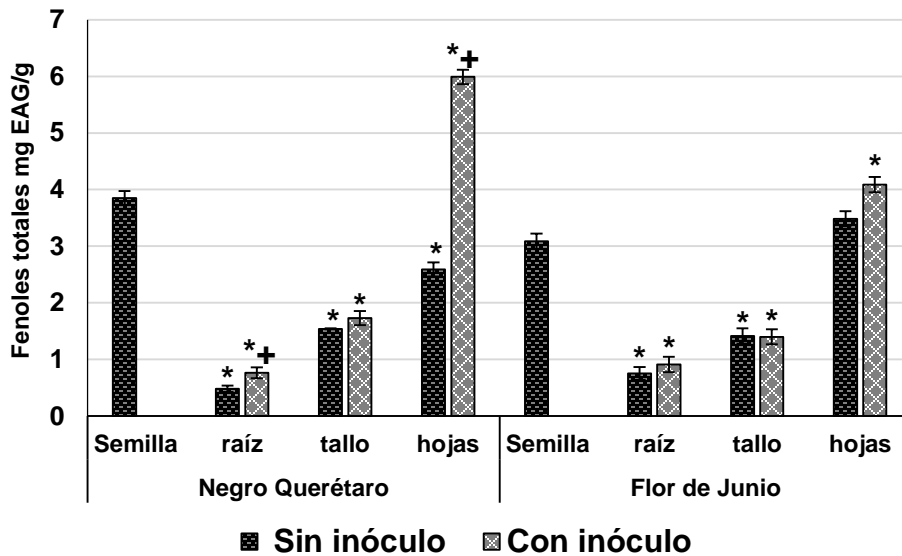


Figura 5. Contenido de fenoles totales en etapa R6. MF ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla. + denota diferencias significativas entre etapas respecto al inóculo por cultivar.

Las vainas del cultivar Flor de Junio en la etapa de maduración (R9) presentan una concentración de 6.0 mg EAG/g y esta concentración de fenoles es mayor en comparación con la semilla. Además las vainas incrementan 1 mg EAG/g la concentración en presencia del inoculante. Las hojas del cultivar Negro Querétaro en presencia del inoculante presentan una disminución de 2.0 mg EAG/g comparadas con las hojas de la etapa R6, razón por la cual son estadísticamente igual a las semillas en esta etapa. Para esta etapa en general los demás tejidos presentan menor concentración de compuestos fenólicos que la semilla y sin cambios por la presencia del inoculante. La raíz sigue siendo el tejido con menor concentración de fenoles para ambos cultivares (Fig. 6).

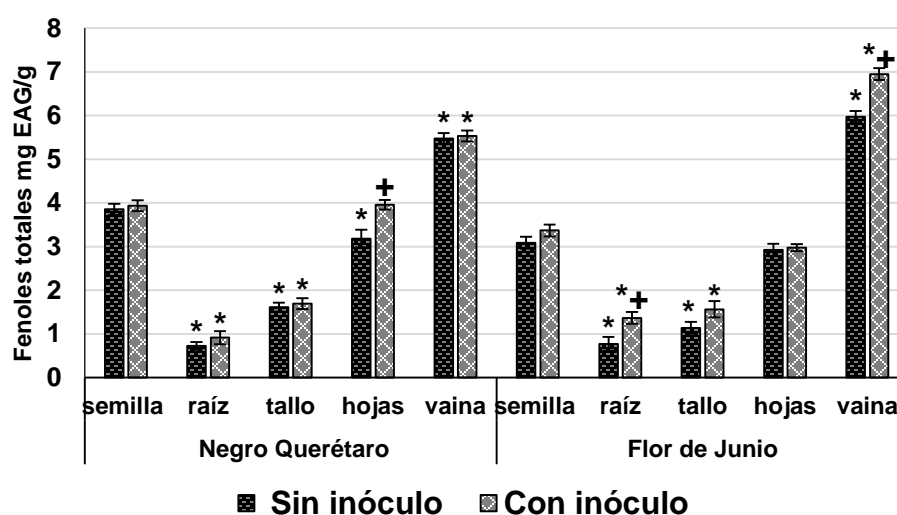


Figura 6. Contenido de fenoles de los tejidos en etapa R9. MF ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla. + denota diferencias significativas entre etapas respecto al inóculo por cultivar.

## 7.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante se determinó por tres métodos diferentes el ensayo de captación 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o ABTS, ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil o DPPH y capacidad antioxidante por hierro reducido o FRAP.

La concentración de los extractos se normalizó a 10 µg/mL, sin embargo, la actividad antioxidante es diferente para cada extracto de los tejidos. Los tejidos presentaron diferencias en dos de los tres métodos ensayados y en todos los tejidos de las diferentes etapas fenológicas. Dado que las etapas R6 y R9 son estadísticamente igual a la semilla en concentración de compuestos fenólicos se detalla la actividad antioxidante de cada tejido en cada método.

### 7.2.1 Ensayo ABTS

La actividad antioxidante ABTS de la semilla es de 95 equivalentes µM de trolox en el cultivar Negro Querétaro y de 88 equivalentes µM de trolox en Flor de Junio. En la etapa de floración (etapa R6) en ambos cultivares sin presencia del inoculante todos los tejidos presentan diferencias significativas. Sin embargo, solo las hojas tienen mayor actividad antioxidante que las semillas. La presencia de *A. agilis* UMCV2 en ambos cultivares incrementa la actividad del tallo, con este incremento el tallo es estadísticamente igual a la semilla. Por otra parte, las hojas tienen una disminución de la actividad en un 11%. La actividad de la raíz disminuye en el cultivar Negro Querétaro. La raíz del cultivar Flor de Junio incrementa su actividad, sin embargo, no iguala a la actividad presentada por la semilla (Fig. 7).

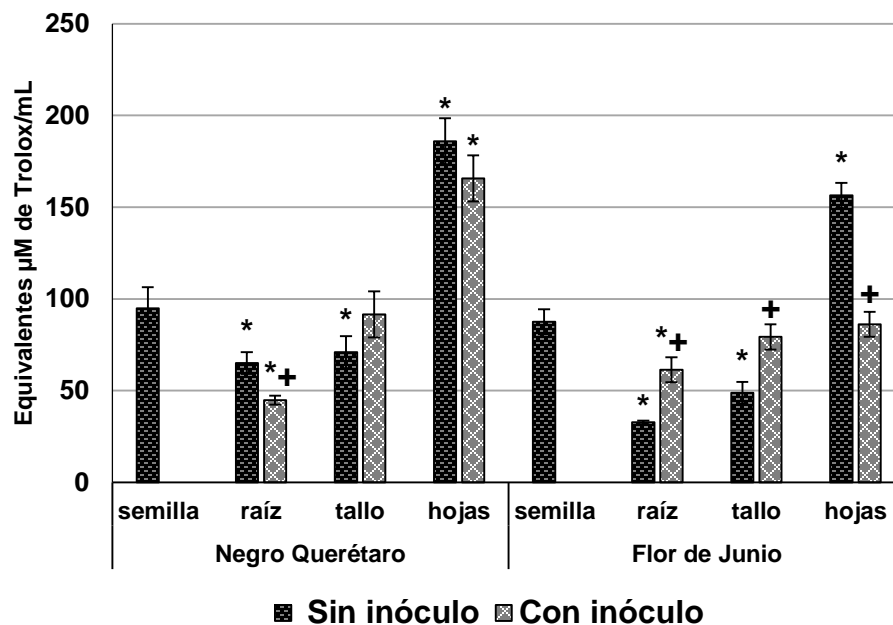


Figura 7. Actividad antioxidante para el radical ABTS en la etapa R6 para ambos cultivares. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

En la etapa R9 de las plantas sin inóculo, la raíz y las hojas son diferentes estadísticamente a la semilla. Las hojas presentan mayor actividad. El tallo y las vainas son estadísticamente igual a la semilla para el cultivar Negro Querétaro mientras que en el cultivar Flor de Junio todos los tejidos tienen la misma actividad que la semilla (Fig. 8). Por otra parte la presencia del inóculo en el cultivar Negro Querétaro no modifica la actividad de la semilla, la raíz y las hojas. El tallo presenta una disminución de 16.5%. Las vainas, por otra parte, incrementan un 10% la actividad antioxidante superando la presentada por la semilla. En el cultivar Flor de Junio la semilla, raíz y tallo no modifican su actividad. Las hojas presentan una disminución y las vainas al igual que en el cultivar Negro Querétaro incrementan la actividad antioxidante en un 12% (Fig. 8).

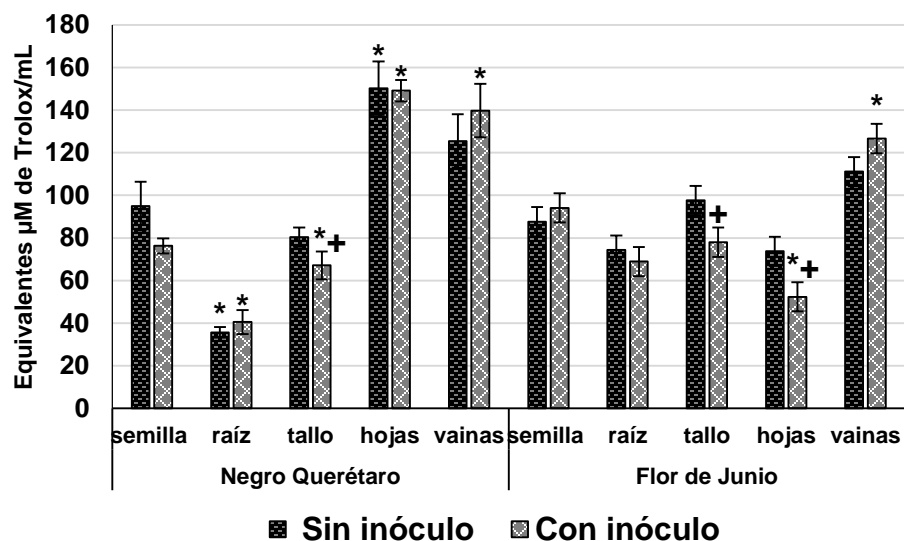


Figura 8. Actividad antioxidante con el radical ABTS. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

El germinado es estadísticamente igual a la semilla solo en el cultivar Flor de Junio. La actividad antioxidante de los tejidos en etapa V3 incrementa con la presencia del inoculante en el cultivar Negro Querétaro siendo mayor en la raíz y el tallo comparado con la semilla. Las hojas sin inóculo el cultivar flor de Junio tienen mayor capacidad antioxidante que la semilla, sin embargo, ésta disminuye con el inoculante. Las hojas en etapa R8 tienen mayor capacidad antioxidante que la semilla en ambos cultivares. La presencia del inoculante incrementa la actividad en el tallo más de un 50% y la disminuye en las hojas del cultivar Negro Querétaro. Las hojas del cultivar Flor de Junio incrementan su actividad antioxidante, contrario a lo que sucede en el cultivar Negro Querétaro (Anexo B).

### 7.2.2 Ensayo DPPH

La actividad antioxidante de las semillas contra el radical DPPH en el cultivar Flor de Junio es de 107 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox y de 108 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox para el Negro Querétaro. Los tejidos del cultivar Flor de Junio no presentan diferencias significativas con respecto a la semilla, lo cual significa que todos los extractos a la concentración de  $10 \mu\text{g/mL}$  tiene la misma actividad antioxidante para inhibir al radical. En base a esto, se esperaría que aquellos tejidos con mayor contenido de fenoles tuvieran mayor actividad antioxidante. Dentro de la etapa R6 para el cultivar Negro Querétaro los tejidos, incluyendo la semilla, se encuentran

con una actividad entre los 102 a 137 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox. Sin embargo, las hojas en presencia del inoculante muestran la mejor capacidad de neutralizar al radical DPPH en un 21% mayor comparado con la semilla. En el cultivar Flor de Junio las hojas en presencia del inoculante tienen una actividad antioxidante de 122 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox. La actividad antioxidante de las hojas del cultivar Flor de Junio, por lo tanto, es mayor en comparación a la actividad antioxidante de la semilla. La actividad de la raíz y tallo se encuentran en 103 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox (Fig. 9).

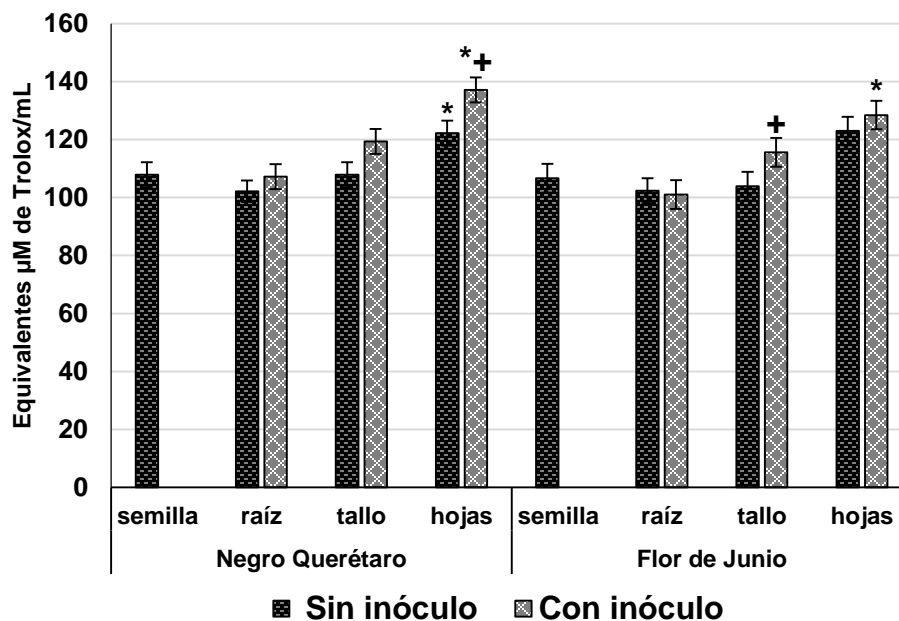


Figura 9. Actividad antioxidante de los diferentes tejidos en etapa R6 para ambos cultivares de frijol. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

En la etapa R9 la actividad antioxidante se encuentra en un intervalo de 74 a 116 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox para el cultivar Negro Querétaro. Las vainas y el tallo tienen la misma capacidad antioxidante que la semilla. Además dicha actividad antioxidante, no se modifica por la presencia de *A. agilis* UMCV2. La raíz presenta una actividad menor en comparación con la semilla. La actividad de la raíz incrementa 22 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox con el inoculante, sin embargo, no supera la actividad de la semilla. Las hojas presentan mayor actividad que la semilla cuando no se tienen bajo el sistema de inoculación (Fig. 10). En el cultivar Flor de Junio la semilla mantiene su actividad aún en presencia del inoculante. La raíz y el tallo tienen la misma capacidad de neutralizar al radical (con y sin inoculación) que la semilla. Las hojas, por otra parte, presentan mayor actividad

que la semilla en un 14% sin inoculación. Las vainas incrementan la actividad por la presencia de *A. agilis* UMCV2 superando así a la semilla con un 12% (Fig. 10).

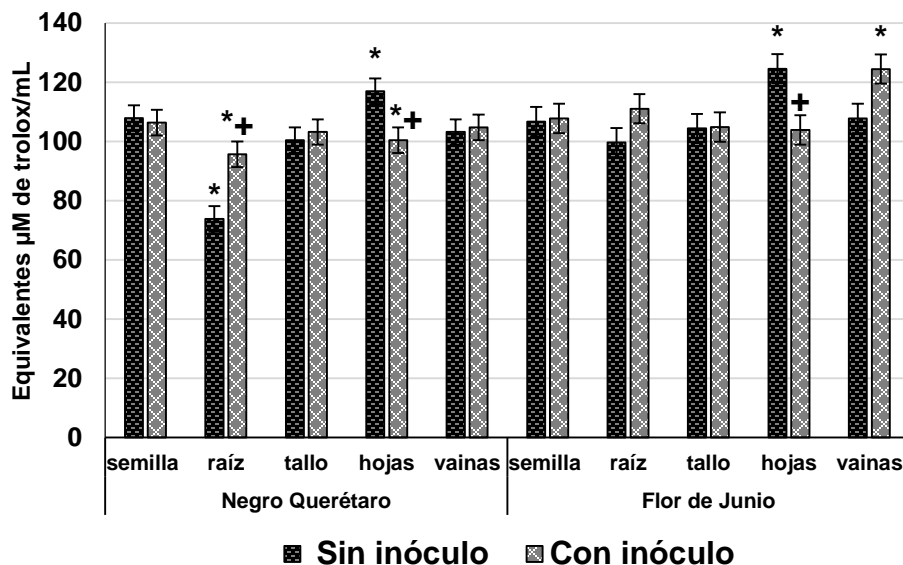


Figura 10. Actividad antioxidante para el radical DPPH en etapa R9. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

La actividad antioxidante del germinado (V0) es estadísticamente igual a la semilla a excepción del germinado con inoculación del cultivar Flor de Junio, el cual presenta mayor actividad que la semilla. Los tejidos de la etapa V3 tienen la misma capacidad antioxidante. Las hojas de las plantas bajo el sistema de inoculación en etapa R8 son el único tejido con mayor actividad que la semilla en el cultivar Flor de Junio. El tallo del cultivar Negro Querétaro incrementa su actividad con la inoculación en un 23% superando de esta manera la actividad de la semilla. Sin embargo, las hojas sin inoculación ya presentan mayor actividad que la semilla, la cual disminuye con la inoculación (Anexo C).

### 7.2.3 Ensayo FRAP

En el ensayo FRAP la actividad antioxidante de la semilla del frijol Negro Querétaro es de 99 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox mientras que la actividad de la semilla del frijol Flor de Junio es de 80 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox. Los tejidos en la etapa R6 sin inoculación son estadísticamente diferentes a la semilla. La raíz y el tallo tienen menor actividad y las hojas mayor actividad comparados con la actividad de la semilla en ambos cultivares. Los tejidos de las plantas con el sistema de inoculación en el cultivar Negro Querétaro no presentan modificaciones. Contrario a ello las hojas del cultivar Flor de Junio disminuyen la actividad antioxidante 79 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox lo cual las hace estadísticamente igual a la semilla (Fig. 11).

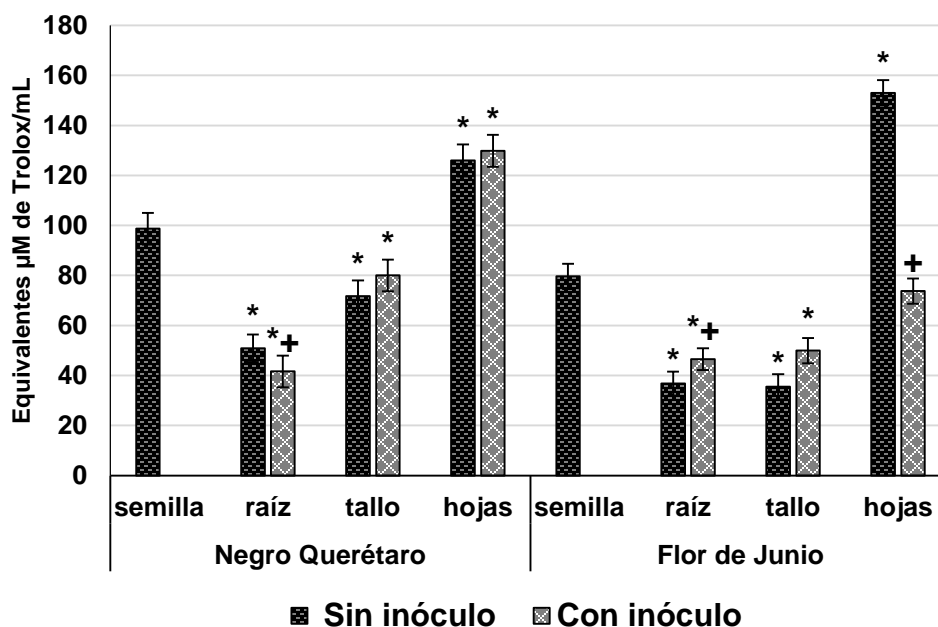


Figura 11. Actividad antioxidante FRAP en etapa R6. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

Dentro de la etapa R9, las hojas sin inoculación con 154 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox y las vainas bajo el sistema de inoculación con 116 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox mostraron mejor capacidad antioxidante que la semilla en el cultivar Negro Querétaro. El tallo y las hojas sin inoculación del cultivar Flor de Junio tienen mayor capacidad antioxidante que la semilla la cual disminuye en un 50% con la

presencia del inoculante. La capacidad antioxidante de las vainas sin inoculante es igual a la semilla pero se ve incrementada con 10 equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox con la presencia de *A. agilis* UMCV2. La actividad más baja se obtiene con la raíz y la presencia del inoculante no muestra diferencias significativas (Fig. 12).

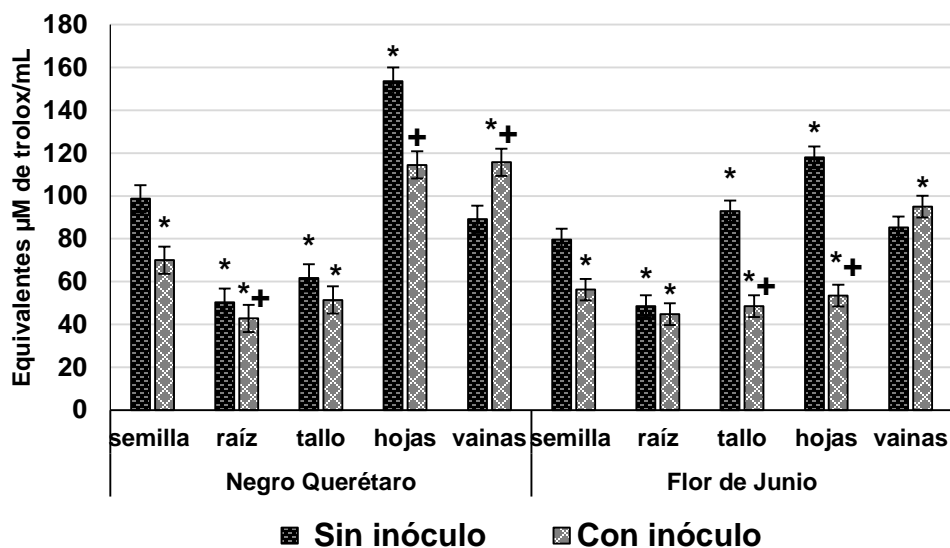


Figura 12. Actividad antioxidante de los diferentes tejidos en etapa R9. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

El germinado (etapa V0) así como la raíz y el tallo de la etapa V3 tienen menor capacidad antioxidante que la semilla en ambos cultivares. Contrario a ello las hojas igualan a la semilla en el cultivar Negro Querétaro y en Flor de Junio la incrementan en un 40%. El tallo bajo el sistema de inoculación incrementa la actividad más del 50% en ambos cultivares. Los tejidos dentro de la etapa R8 con mejor resultado se obtuvieron en las hojas sin inoculante seguido por las hojas y vainas con inoculante. La actividad más baja se observa en el tallo y la raíz, en ambos tejidos la presencia de *A. agilis* UMCV2 no modifica esta actividad (Anexo D).

### 7.3 ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Los compuestos fenólicos provenientes de la semilla tienen efecto citotóxico en contra de una amplia gama de líneas celulares cancerosas entre las que podemos citar de colón, mama, hígado etc., por lo que una vez establecido el cáncer podrían fungir como agentes terapéuticos. Los tejidos de la planta de frijol pueden ser una fuente alterna a la semilla de compuestos fenólicos por lo que se determinó el efecto citotóxico de los extractos crudos en *Artemia salina*.

En los extractos de los tejidos sin inóculo del cultivar Flor de Junio la  $CL_{50}$  se encuentra en un intervalo de 1.7- 3.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , incluyendo la semilla, alcanzando la muerte del 100% de las *Artemias* en tiempos que van desde 10 minutos hasta 80 minutos. La mejor actividad citotóxica se presenta con la raíz en etapa V3, el tallo y las hojas en etapa R6 sin la presencia del inoculante ya que a diferencia de los demás tejidos actúan a un tiempo muy corto de tan solo 10 minutos. Para los tejidos inoculados tenemos la  $CL_{50}$  en un intervalo de 1.7- 4.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  alcanzando el 100% de muerte con tiempos que van desde los 10 a los 60 minutos. Los tejidos con mejor actividad bajo este sistema de inoculación son el tallo en etapa V3 y la raíz en etapa R6. Los demás tejidos si bien no muestran cambios en la  $CL_{50}$  si incrementan el tiempo de acción, es decir disminuyen su potencia (Tabla 5). La  $CL_{50}$  de los tejidos sin inoculante en el cultivar Negro Querétaro, incluyendo la semilla, se encuentran en un intervalo de 1.6-3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El objetivo del 100% de muerte se obtiene en tiempos de 10 a 60 minutos. Los tejidos con mejor actividad citotóxica son la raíz con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el tallo con 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en etapa V3 con un tiempo de 10 minutos. En los tejidos inoculados se reducen los tiempos a un intervalo de 10 a 50 minutos con  $CL_{50}$  entre 1.4-3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El tallo en etapa V3 y la raíz en etapa R6 y R8 son los tejidos que presentan la mejor actividad citotóxica. Por otra parte tejidos como las hojas en etapa V3 en presencia del inoculante no modifica la  $CL_{50}$  pero si disminuye el tiempo de acción de 70 a 30 minutos. En la raíz de la etapa R6 se modifican ambos parámetros tanto la  $CL_{50}$  como el tiempo (Tabla 6). La  $CL_{50}$  de los tejidos es muy similar para ambos cultivares la diferencia radica en el tiempo en el cual se alcanza el 100% de muerte de *Artemia salina*.

Tabla 5. Actividad citotóxica de los extractos metanólicos del cultivar Flor de Junio.

ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO		CON INÓCULO	
		CL <sub>50</sub> (µg/mL)	TIEMPO (min)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	TIEMPO (min)
V0	Germinado	2.3	30	2.4	40
V3	Raíz	2.2	10	1.8	40
	Tallo	2.3	60	3.5	10
	Hojas	2.8	50	1.9	50
R6	Raíz	3.0	80	2.6	10
	Tallo	2.2	10	2.2	20
	Hojas	2.3	10	1.8	40
R8	Raíz	2.3	30	2.4	50
	Tallo	1.8	20	2.4	40
	Hojas	1.8	40	2.4	40
	Vainas	1.6	30	1.8	40
R9	Raíz	3.4	40	4.5	50
	Tallo	1.8	40	s/a	s/a
	Hojas	2.8	30	2.5	60
	Vainas	2.4	30	2.3	40
	Semillas	2.2	20	2.6	20

Tabla 6. Actividad citotóxica de los extractos metanólicos del cultivar Negro Querétaro.

ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO		CON INÓCULO	
		CL <sub>50</sub> (µg/mL)	TIEMPO (min)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	TIEMPO (min)
V0	Germinado	2.2	40	2.1	20
V3	Raíz	2.5	10	1.9	20
	Tallo	1.8	10	2.8	10
	Hojas	2.1	70	2.4	30
R6	Raíz	2.2	60	1.6	10
	Tallo	1.7	60	1.9	50
	Hojas	2.8	30	2.3	40
R8	Raíz	2.0	20	2.2	10
	Tallo	2.6	20	3.2	50
	Hojas	3.2	20	s/a	s/a
	Vainas	1.5	20	2.6	30
R9	Raíz	2.3	60	1.5	30
	Tallo	2.8	30	1.6	30
	Hojas	2.7	40	1.6	40
	Vainas	2.0	30	2.5	30
	Semillas	1.8	20	1.9	20

## 7.4 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Para establecer la relación entre el contenido de fenoles y las variables antioxidante, antimicrobiana y citotóxica se realizó un análisis de componentes principales. Los resultados para el cultivar Flor de Junio indican que 2 componentes representan el 94.27% del total de la varianza (Fig. 13). El componente principal 1 representa el 64.11% mientras que el componente 2 representa el 30.16%.

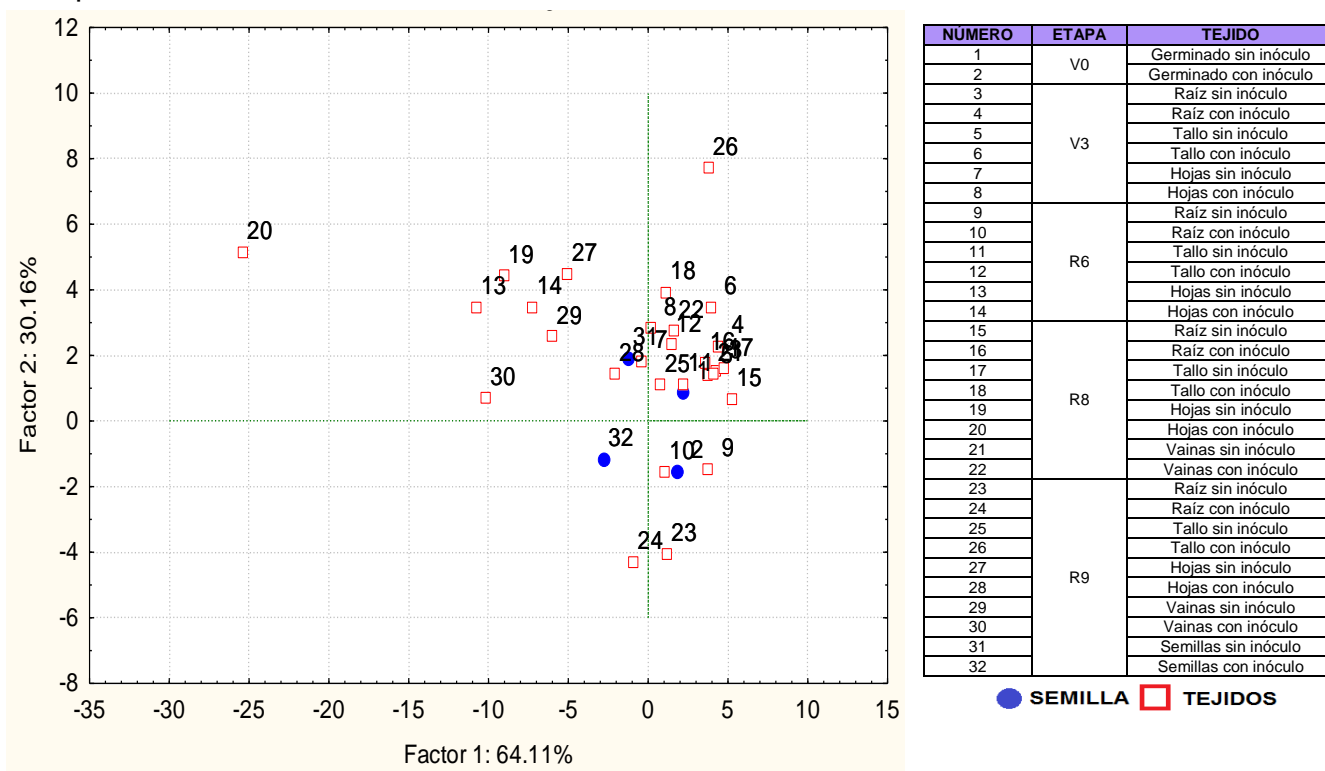


Figura 13. Análisis de componentes principales en el cultivar Flor de Junio.

Mediante este análisis se puede observar que la semilla en etapa V0 y maduración sin inóculo, representadas por el número 1 y 31, se agrupan separándose de las semillas con inóculo. La mayoría de los tejidos se agrupan con las semillas sin inóculo, lo que explica que sus actividad antioxidante y biológica sea muy similar. Dentro de los tejidos que se agrupan con las semillas en presencia del inóculo se encuentran la raíz en etapa R6 y en R9. Por otra parte los tejidos como las hojas en etapa R6, R8 y R9 (13, 14, 19 y 20) y las vainas (29 y 30) tienen una agrupación completamente diferente a los demás tejidos incluyendo la semilla lo que se pudo observar tanto en la concentración de compuestos fenólicos como en la actividad antioxidante, ya que estos tejidos representan mayor concentración de

compuestos fenólicos y por lo tanto mejor actividad antioxidante en comparación con la semilla.

Para el cultivar Negro Querétaro el componente principal 1 representa el 66.55% el componente principal 2 un 21.20%. Contrario al cultivar Flor de Junio para este cultivar los tejidos tienen una agrupación más homogénea (Fig. 14).

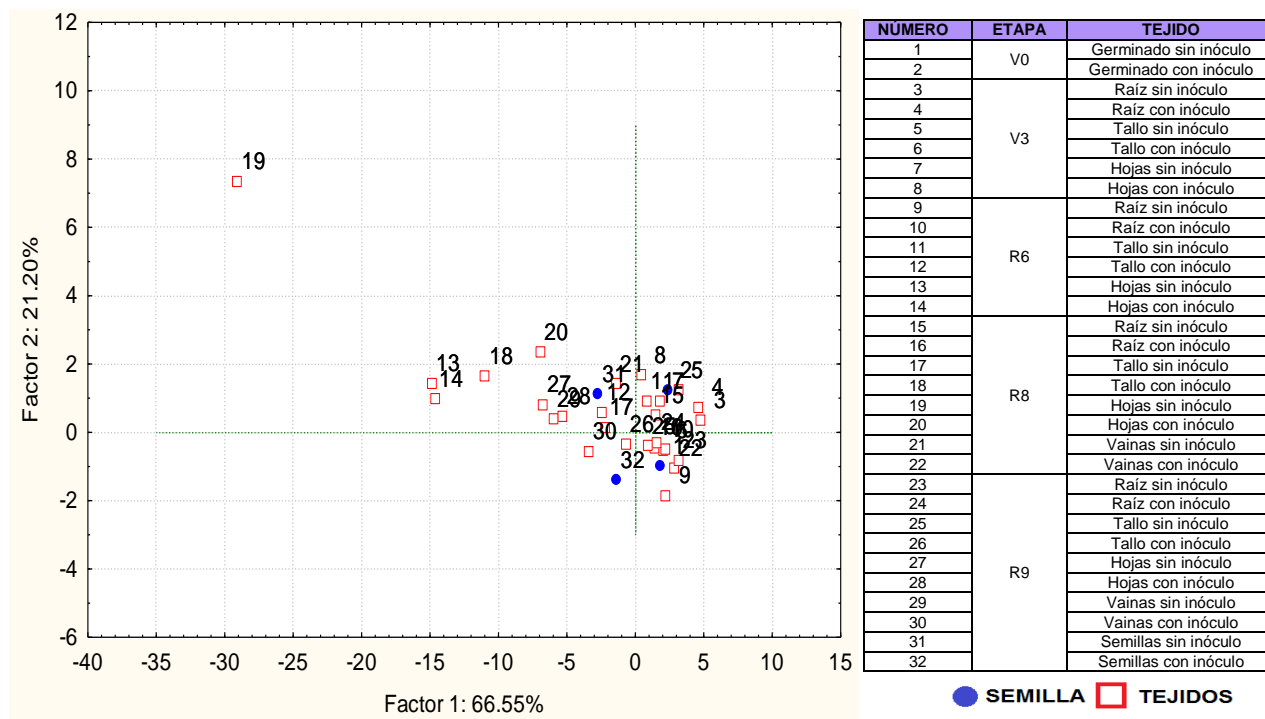


Figura 14. Análisis de componentes principales para el cultivar Negro Querétaro.

Las semillas tienen el mismo comportamiento que en el frijol Flor de Junio tienden a agruparse aquellas sin inóculo (1 y 31) y por otra parte con inóculo (2 y 32), la mayoría de los tejidos se incluyen dentro de esta gran agrupación, sin embargo las hojas en etapa R6 y R8 y el tallo en etapa R8 tienden a separarse, es decir representan una actividad diferente a la semilla, tienen tanto mayor concentración de fenoles totales como mejor actividad antioxidante.

## 7.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS POR HPLC

En base a los resultados anteriores se analizó el perfil cromatográfico de cada una de las muestras. En total se identificaron 41 compuestos para el cultivar Flor de Junio, de los cuales solamente 12 están presentes en la raíz y absorben a una longitud de onda de 250 nm. De acuerdo a los estándares utilizados para este tejido solamente se identificó un compuesto, el ácido quínico, el cual se incrementó en un 4% en presencia del inoculante. Los compuestos representados por las señales 2, 3, 4, 15 y 35 únicamente aparecen en la raíz sin inóculo, mientras que las señales 14, 18, 22 y 26 solo se encuentran en la raíz en presencia del inoculante. La raíz inoculada presenta una disminución importante de los picos 6 y 11 del 16 y 7 % respectivamente. En el tallo se encuentran presentes 16 compuestos de los cuales se lograron identificar 3; la señal número 1 es el ácido quínico, la señal 17 corresponde al ácido clorogénico y el número 28 al ácido p-cumárico. Los compuestos tuvieron un incremento en presencia del inoculante de un 10% para el ácido quínico, un 3% para el ácido clorogénico y 1% para el ácido p-cumárico con respecto al tallo sin inóculo. Las señales 24, 27, 29, 32, 33 y 39 aunque no se lograron identificar tuvieron de igual manera un incremento en el tallo inoculado. El más importante corresponde al pico 29 con un incremento del 8%. Por otro lado las señales 5, 16 y 34 mostraron una disminución para el tallo en presencia del inoculante mientras que las señales 8 y 9 solo se presentaron en el tallo control. Las señales 10 y 25 solo se encuentran en el tallo inoculado.

Las hojas en etapa R6 presentaron 12 señales importantes de los cuales se identificaron 5. La señal número 1 que corresponde al ácido quínico disminuyó un 2% para las hojas inoculadas. La señal número 20 que solo se encuentra presente en las hojas inoculadas se identificó como el ácido cafeico. El ácido p-cumárico disminuyó en un 3% con respecto a las hojas sin inóculo y se representa con la señal número 28. La señal número 31 que representa al ácido ferúlico tuvo un incremento del 1% en las hojas sin inóculo y el ácido rosmarínico que disminuyó en un 2% en las hojas inoculadas corresponde al pico 38. Para las señales 8 y 21 hubo un incremento del 14 y 2% respectivamente contrario a ello las señales 23, 24, 27 y 32 presentaron una disminución para las hojas en presencia del inoculante. Por último la señal con el número 5 se mantuvo en ambos casos.

Tabla 7. Perfil de compuestos identificados para el cultivar Flor de Junio.

Nº DE SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)									COMPUESTO
		RAÍZ V3		TALLO V3		HOJAS R6		HOJAS R8		VAINAS R9	
		SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	CON INÓCULO	
1	2.04	16	20	14	24	16	14	12	11	7	Ácido quínico
2	2.256	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	3.01	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	3.64	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	4.75	0	0	23	2	6	6	7	5	0	
6	4.90	19	3	0	0	0	0	0	0	0	
7	21.77	0	0	0	0	0	0	1	3	0	
8	22.38	0	0	5	0	10	24	0	0	0	
9	22.42	0	0	11	0	0	0	0	0	0	
10	22.94	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
11	22.62	9	2	0	0	0	0	0	0	0	
12	22.61	0	0	0	0	0	0	21	29	4	
13	23.16	0	0	0	0	0	0	1	2	6	
14	23.13	0	37	0	0	0	0	0	0	0	
15	23.34	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	23.36	0	0	2	1	0	0	0	0	0	
17	23.56	0	0	2	5	0	0	2	4	0	Ácido clorogénico
18	23.53	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
19	23.69	0	13	0	0	0	0	0	0	0	
20	24.05	0	0	0	0	0	2	1	1	3	Ácido cafeico
21	24.34	0	0	0	0	3	5	2	4	0	
22	24.45	0	13	0	0	0	0	0	0	0	
23	24.61	0	0	0	0	8	7	7	8	0	
24	24.88	0	0	1	3	10	7	2	3	0	
25	25.05	0	0	0	3	0	0	7	8	0	
26	25.18	0	13	0	0	0	0	0	0	0	
27	25.26	0	0	4	4	17	16	25	7	0	
28	25.47	0	0	2	3	4	1	4	2	0	Ácido p-cumárico
29	25.67	0	0	12	20	0	0	0	0	8	
30	25.67	0	0	0	0	0	0	1	3	0	
31	26.26	0	0	0	0	2	3	0	0	0	Ácido ferúlico
32	26.68	0	0	3	5	16	9	8	11	6	
33	26.63	0	0	5	8	0	0	0	0	0	
34	27.18	0	0	9	7	0	0	0	0	0	
35	27.56	33	0	0	0	0	0	0	0	6	
36	27.86	0	0	0	0	0	0	0	0	24	
37	28.51	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
38	28.71	0	0	0	0	7	5	0	0	0	Ácido rosmarínico
39	29.85	0	0	8	10	0	0	0	0	7	
40	30.61	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
41	34.19	0	0	0	0	0	0	0	0	8	

Las hojas en etapa R8 presentaron 15 compuestos, de los cuales se identificaron 4. La señal número 1 corresponde, al igual que en los demás tejidos, al ácido quínico con un 12% para las hojas sin inóculo y un 11% para las hojas en presencia del inoculante. El ácido clorogénico presenta un incremento del 2% en las hojas con inoculante y corresponde a la señal número 17. La señal 20 que representa al ácido cafeico se mantuvo sin modificaciones y el ácido p-cumárico corresponde a la señal 28 el cual disminuyó 2% en las hojas inoculadas. Las señales restantes no se lograron identificar pero si hubo cambios entre las hojas sin inóculo y las inoculadas. Las señales 5 y 27 tuvieron una disminución para las hojas en presencia del inoculante mientras que los picos 7, 12, 13, 21, 23, 24, 25, 30 y 32 tuvieron un incremento entre 1-8%. Las vainas con inóculo mostraron en total 13 compuestos. Las señales 1, 18, 29, 35, 36, 37, 39, 40 y 41 absorben a una longitud de onda de 250 nm. El ácido quínico es el único compuesto que se identificó en las vainas. Por otra parte los compuestos representados por las señales 12, 13, 20 y 32 absorben a una longitud de onda de 320. La señal número 20 corresponde al ácido cafeico. (Tabla 7).

Para el cultivar Negro Querétaro se identificaron 42 compuestos en total y no todos se encuentran presentes en todos los tejidos analizados. La raíz en etapa R9 presentó 13 compuestos de los cuales hasta el momento se tiene identificado al ácido quínico. El ácido quínico corresponde a la señal número 2 con 5% para aquella sin inóculo y 6% con inoculante. Las doce señales restantes no se han identificado y corresponden a los números 1, 9, 17 y 22 con una importante disminución, contrario a ello las señales 12, 13, 15, 23, 24 y 37 mostraron un incremento, ambos casos en las hojas inoculadas. Las señales número 10 y 19 no mostraron cambios. Para las vainas en etapa R8 se lograron identificar 3 compuestos de los 9 que se presentaron. La señal 2 correspondiente al ácido quínico con un 13% en las vainas sin inóculo y un 5% para el tratamiento. La señal número 3 es el ácido dihidroxibenzoico con un 10% para aquellas sin inóculo y un 3% para las inoculadas. El ácido hidroxibenzoico correspondiente a la señal número 8 con un 1% para las vainas sin inóculo y un 3% para las vainas inoculadas. La señal número 5 no se ha identificado pero presenta un incremento importante del 29%. Los compuestos representados por las señales 10, 17, 24, 25 y 30 por el contrario disminuyeron, ambos casos para las vainas en presencia del inoculante.

En el tallo etapa R6 se identificaron 4 compuestos de los 13 que se presentaron. La señal correspondiente al número 2 con un 28% para el tallo sin inóculo y un 18% para el tallo con inóculo corresponde al ácido quínico. La señal número 16 con un 6% para aquel sin inóculo y un 5% para el tallo en presencia del inoculante es el ácido clorogénico. La señal 28 y 29 con un 4% y 5% se encuentran solo en el tallo con inoculante y corresponden a los ácidos p-cumárico y ferúlico respectivamente. Las señales 4, 6, 11, 21, 30 y 41 tuvieron una disminución en presencia del inoculante, mientras que los compuestos representados por las

señales 35 y 36 solo se encuentran presentes en el tallo con inóculo y la señal número 17 que mantiene un 13% para ambos casos. Finalmente las hojas en etapa R6 presentaron el mayor número de compuestos. Se identificaron 6 de los 20 que presentan. El ácido quínico corresponde a la señal número 2 con un 11% para las hojas sin inóculo y un 19% para las hojas con inoculante. La señal número 8 con tan solo 0.05% para aquellas sin inóculo y un 0.09% para el tratamiento corresponde al ácido hidroxibenzoico. El ácido clorogénico con un 0.5% para las hojas sin inóculo y un 0.9% para las hojas sin inóculo se encuentra en la señal número 16. La señal número 20 incrementó un 2% en las hojas con inoculante y corresponde al ácido cafeico. El ácido p-cumárico se mantuvo en 1% en ambos casos y corresponde a la señal número 28. La última señal identificada es la número 29 y se trata del ácido ferúlico. Las señales que presentaron un incremento en las hojas con inoculante son los número 6, 7, 14, 18 y 34, efecto contrario, es decir una disminución, fue para los compuestos con los números de señales 26, 27, 31, 33, 38, 39, 40 y 42. La señal número 32 se mantuvo sin ningún cambio (Tabla 8)

Tabla 8. Perfil de compuestos identificados para el cultivar Negro Querétaro.

Nº DE SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)								COMPUESTO
		Raíz R9		Vainas R8		Tallos R6		Hojas R6		
		SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	
1	1.77	4	3							
2	2.05	5	6	13	5	28	18	11	19	Ácido quínico
3	2.39	0	0	10	3	0	0	0	0	Ácido dihidroxibenzoico
4	2.52	0	0	0	0	4	6	0	0	
5	4.8	0	0	50	79	0	0	0	0	
6	5.26	0	0	0	0	9	4	2	3	
7	14.41	0	0	0	0	0	0	8	13	
8	15.73	0	0	1	3	0	0	0.05	0.09	Ácido hidroxibenzoico
9	22.42	4	3	0	0	0	0	0	0	
10	22.69	2	2	2	1	0	0	0	0	
11	22.96	0	0	0	0	7	6	0	0	
12	23.05	9	10	0	0	0	0	0	0	
13	23.13	15	16	0	0	0	0	0	0	
14	23.24	0	0	0	0	0	0	7	12.0	
15	23.36	3	5	0	0	0	0	0	0	
16	23.69	0	0	0	0	6	5	0.5	0.9	Ácido clorogénico
17	23.81	18	13	3	1	13	13	0	0	
18	23.85	0	0	0	0	0	0	1	2	
19	24.04	3	3	0	0	0	0	0	0	
20	24.06	0	0	0	0	0	0	1	3	Ácido cafeico
21	24.97	0	0	0	0	6	5	0	0	
22	24.44	13	11	0	0	0	0	0	0	
23	24.63	3	5	0	0	0	0	0	0	
24	25.14	15	16	3	1	0	0	0	0	
25	25.65	0	0	10	4	0	0	0	0	
26	25.04	0	0	0	0	0	0	3	2	
27	25.4	0	0	0	0	0	0	10	7	
28	25.78	0	0	0	0	0	4	1	1	Ácido p-cumárico
29	26.09	0	0	0	0	0	5	7	3	Ácido ferúlico
30	26.52	0	0	9	4	21	16	0	0	
31	26.63	0	0	0	0	0	0	9	6	
32	27.03	0	0	0	0	0	0	2	2	
33	27.31	0	0	0	0	0	0	3	2	
34	27.54	0	0	0	0	0	0	2	4	
35	27.89	0	0	0	0	0	7	0	0	
36	28.14	0	0	0	0	0	4	0	0	
37	28.47	5	8	0	0	0	0	0	0	
38	29.88	0	0	0	0	0	0	7	3	
39	30.52	0	0	0	0	0	0	12	7	
40	31.27	0	0	0	0	0	0	5	4	
41	31.98	0	0	0	0	8	6	0	0	
42	34.5	0	0	0	0	0	0	8	4	

## 8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los fenoles son compuestos químicos con al menos un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo (Harborne. 1980). Sin embargo también son un grupo importante de metabolitos secundarios los cuales se consideran compuestos que no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales en la planta pero que son importantes para que interactúe con su entorno para adaptarse y defenderse, por lo que confieren una clara ventaja de supervivencia. La síntesis de metabolitos secundarios depende en gran medida de la fase fisiológica y de desarrollo de la planta (Ramakrishna y Ravishankar. 2011). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos ya que se observa que en las 5 etapas analizadas la concentración de fenoles totales es diferente (Fig. 3). La etapa correspondiente a la semilla en proceso de germinación (V0) la concentración de fenoles totales es de 2.0 mg EAG/g para el cultivar Negro Querétaro y 1.0 mg EAG/g para Flor de Junio. La semilla madura presenta 4.0 y 3.0 mg EAG/g en Negro Querétaro y Flor de Junio respectivamente. Lo anterior no coincide con Dávila. *et al.* (2015) quienes argumentan un incremento de compuestos fenólicos durante el proceso de germinación. En otro estudio realizado por Díaz-Batalla. *et al.* (2006) observan un incremento de quercetina, ácido vainillico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico en germinados principalmente de variedades negras. La actividad antioxidante para esta etapa sin embargo es estadísticamente igual a la semilla por el método de DPPH en ambos cultivares (Fig. B1) y ABTS solo en Flor de Junio (Fig. A1). En los tejidos también se observó diferente concentración de compuestos fenólicos. La raíz es el tejido en el que se encontró la menor concentración de fenoles totales en todas las etapas analizadas a pesar de que su función además de soporte y toma de agua y nutrientes también es la de exudar compuestos de diferente naturaleza con funciones específicas. Existe una gran diversidad estructural en los exudados de la raíz que van desde moléculas relativamente sencillas hasta moléculas más complejas estructuralmente como los flavonoides (Oliveros Bastidas A. de J. *et al.* 2009). Los flavonoides, específicamente en este tejido ayudan a establecer el fenómeno de simbiosis con el género *Rhizobium* (Quinto C. y Cárdenas L. 2011).

La síntesis de compuestos fenólicos se da principalmente en las hojas y posteriormente son transportados a otros órganos y tejidos por lo que el contenido de fenoles totales en las hojas es mayor que en los demás tejidos (Oziyigit. 2008). Con lo anterior se puede explicar la razón por la cual en todas las etapas analizadas las hojas son el tejido con mayor concentración de compuestos fenólicos, a excepción de la etapa R9 en donde la vaina contiene mayor concentración de compuestos fenólicos que las hojas. Las concentraciones de las compuestos fenólicos en las hojas además son estadísticamente igual a la semilla en las etapas R8 (Fig. A3) y R9 (Fig. 5) en ambos cultivares y en la etapa R6 únicamente en el cultivar Flor de Junio (Fig. 4). Los tejidos como la raíz y el tallo en general tienen menor concentración de compuestos fenólicos y menor

capacidad antioxidante comparados con la semilla. Con relación a este comportamiento se ha reportado además que la inducción de compuestos fenólicos por la luz UV y las diversas actividades fisiológicas mediadas por los polifenoles producen un aumento de la concentración de los mismos durante la formación del brote y la etapa de desarrollo temprano de las hojas. Además, las hojas son el principal tejido expuesto a las diversas condiciones ambientales. Las radiaciones solares y la radiación UV en particular no solo estimulan sino también inducen la síntesis de *novo* de muchos compuestos fenólicos. La exposición a rayos UV-B causa temporalmente cambios en las concentraciones fenólicas de las células epidérmicas de las plantas (Lavola. 1998). La concentración de compuestos fenólicos en las hojas es estadísticamente menor en comparación con la semilla en las etapas V3 (Fig. A2) en ambos cultivares. Sin embargo, la actividad antioxidante es igual a la semilla en el cultivar Negro Querétaro y más del doble en el cultivar Flor de Junio en los métodos de ABTS y FRAP. La actividad antioxidante en la etapa R6 de las hojas es superior a la actividad de la semilla en ABTS (Fig. 6), FRAP (Fig. 10) y DPPH (Fig. 8) a pesar de que la concentración de compuestos fenólicos es superior en la semilla para el cultivar Negro Querétaro e igual en Flor de Junio (Fig. 4). La concentración de fenoles totales en las hojas de la etapa R8 es igual que la concentración de la semilla (Fig. A3). Las hojas para el cultivar Negro Querétaro en la etapa R9 presentan menor concentración de fenoles en comparación a la que presenta la semilla. Por otra parte, la concentración de fenoles en las hojas del cultivar Flor De Junio es igual a la semilla (Fig. 5). Sin embargo, la actividad antioxidante sigue siendo mayor en las hojas que en la semilla en ambas etapas por los tres métodos probados para ambos cultivares. Con lo anterior podemos mencionar que la diferencia radica en la variedad estructural dentro de un mismo grupo que a su vez ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, lo cual es parte de la adaptación de la planta (Jiménez. *et al.* 2003). Los compuestos fenólicos tienen una importante actividad antioxidante. Los flavonoides son un grupo importante de compuestos fenólicos, los cuales tienen comúnmente una estructura genérica que consiste en dos anillos aromáticos (anillos A y B) y un anillo heterocíclico oxigenado o anillo C (Liu. 2004) unidos por 3 carbonos (Fig. 15). Los flavonoides difieren en las disposiciones de los grupos laterales hidroxilo, metoxi y glicosídico y en la conjugación entre los anillos A y B (Hammerstone. *et al.* 2000). La variedad estructural que está presente en cada tejido modifica la actividad antioxidante de los flavonoides *in vitro* ya que depende de la disposición espacial de grupos funcionales sobre la estructura nuclear y es tal vez un determinante más importante que el esqueleto de flavan solo. La capacidad de eliminar los radicales libres se le atribuye principalmente a los sustituyentes hidroxilo principalmente aquellos del anillo B los cuales donan hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y dando lugar a un radical flavonoide relativamente estable. Además la presencia de la estructura 3'4' de catecol sobre el anillo B aumenta fuertemente la inhibición de la peroxidación de lípidos. Por ejemplo la luteolina tiene mayor capacidad antioxidante que el kaempferol, ambos tienen las configuraciones de los grupos hidroxilo idénticas,

pero el kaempferol carece del catecol en el anillo B. Además la capacidad antioxidante de los flavonoides está dada por la presencia de un 3-OH libre y la conjugación por parte de los anillos aromáticos. La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 en conjunto con el 3'4' de catecol han sido reportados con 10 veces mayor actividad que aquellos que solo presentan uno de los dos. La presencia del 3-OH le confiere la característica de planar a la molécula lo cual permite la conjugación, la dislocación de los electrones y por lo tanto mayor estabilidad. La ausencia de este 3-OH confiere cierto grado de torsión a la molécula con lo que se anula la coplanaridad y la conjugación, comprometiendo así la capacidad antioxidante (Heim. *et al.* 2002). Otra característica de la variabilidad estructural es la presencia o ausencia de una insaturación entre los carbonos 2-3 en conjugación con un grupo carbonilo en el carbono 4. Los flavonoides con dichas características presentan valores de IC<sub>50</sub> inferiores, indicando de esta manera una fuerte actividad antioxidante (Heim. *et al.* 2002). Tal es el caso de la quercetina y taxifolina, el primero tiene mayor capacidad de reducir el hierro (Ratty y Das. 1988), ambas estructuras tienen el grupo carbonilo pero la taxifolina está saturada entre los carbonos 2 y 3. La presencia de carbohidratos es otra característica que disminuye la actividad antioxidante de los flavonoides, así la capacidad antioxidante disminuye a medida que aumentan los restos glucosídicos. Contrario a ello el aumento del grado de polimerización aumenta la eficacia de las procianidinas frente a una diversidad de especies radicales (Heim. *et al.* 2002).

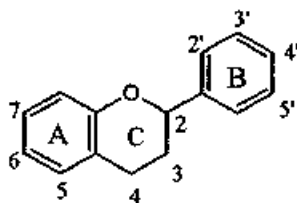


Figura 15. Estructura general de los flavonoides.

Los tejidos de ambos cultivares muestran por tanto diferencias entre sí en la capacidad antioxidante por los tres métodos probados. El método de FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso, por tanto, es un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones, a diferencia de los métodos de ABTS y DPPH los cuales evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres modelo. El DPPH es un radical libre soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente, solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Por otra parte, el ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP),

enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. Mediante este método se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Mercado. *et al.* 2013). Con lo anterior podemos mencionar que la diferencia en la actividad antioxidante en los tejidos de ambos cultivares, además de la estructura de los compuestos también radica en la cantidad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos que se puedan presentar ya que por el método de DPPH no presentaron diferencias en actividad en ambos cultivares, la diferencia se presentó al analizar las muestras con los métodos de FRAP y ABTS.

El estrés oxidativo se ha relacionado ampliamente con diversas enfermedades crónico-degenerativas entre las que podemos incluir el cáncer por lo que el aumento de las defensas antioxidantes mediante la ingesta de fitoquímicos en frutas y verduras puede reducir o retrasar la oxidación del ADN y afectar a las vías de transducción de señales celulares que controlan la proliferación celular y la apoptosis (Liu. 2013). Hemos demostrado que la planta de frijol es rica en compuestos fenólicos con potente actividad antioxidante, incluso mejor que la semilla, por lo que los compuestos fenólicos provenientes de los tejidos podrían ser útil en la prevención y/o tratamiento de dichas enfermedades. Los compuestos fenólicos provenientes de la semilla tienen efecto citotóxico en contra de una amplia gama de líneas celulares cancerosas entre las que podemos citar de colón, mama, hígado, etc., por lo que una vez establecido el cáncer podrían fungir como agentes terapéuticos. Los diferentes tejidos de la planta de frijol tienen una fuerte actividad citotóxica comparables con la actividad de la semilla en ambos cultivares. El intervalo de concentraciones para Flor de Junio esta entre 1.6-4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 5). En el cultivar Negro Querétaro se encuentra en 1.5-2.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 6), concentraciones que están muy por debajo de las reportadas para las semillas de algunas leguminosas como la Soya, de 17.5  $\text{mg}/\text{mL}$  y la lenteja de 18.2  $\text{mg}/\text{mL}$  (Zia-ul-haq M. *et al.* 2013), o incluso la semilla de frijol de algunos cultivares como el Negro Tolosana el cual se encuentra en 1.706  $\text{mg}/\text{mL}$  (López. *et al.* 2013). La actividad citotóxica de todos los tejidos se le atribuye a los compuestos fenólicos, hecho que corroboramos al determinar la  $\text{CL}_{50}$  de los estándares utilizados para la identificación de los compuestos presentes en los tejidos (Anexo H). La  $\text{CL}_{50}$  de todos los tejidos es muy similar en ambos cultivares. Sin embargo el tiempo en el que se logra el 50% de muerte varia en todas las etapas analizadas. Los tejidos como la raíz y el tallo que no mostraron mayor actividad antioxidante en comparación con la semilla, si muestran mayor capacidad citotóxica en etapa V3 para ambos cultivares y en etapa R6 sólo en el cultivar Flor de Junio observando su tiempo de acción 10 minutos menos en comparación con la semilla. Todos los tejidos de la etapa R8 (raíz, tallo, hojas y vainas) tienen igual capacidad citotóxica que la semilla en el cultivar Negro Querétaro mientras que en el cultivar Flor de Junio solo el tallo tiene la misma capacidad que la semilla. En la etapa R9 incrementan los tiempos para todos los tejidos. Martínez. *et al.* (2001) determinaron la inhibición del crecimiento de la línea

de melanoma murino B16F10 por diferentes compuestos polifenólicos como la hesperetina, el eriodictiol, 7,3'-dimetilhesperetina, tangeretina, luteonina y quercetina. En este estudio observaron que en la línea celular de melanoma no hay correlación entre la efectividad de los flavonoides empleados y su actividad antioxidante o captadora de radicales libres. A diferencia de la actividad antioxidante, la estructura de catecol en el anillo B, es insuficiente para inhibir la proliferación celular de la línea cancerosa. Sin embargo, la presencia de varios grupos metoxi en el esqueleto del flavonoide, que reduce significativamente su acción antioxidante, aumenta la acción antiproliferativa sobre B16F10. Estudios previos señalan además que la posición, el número y la sustitución de los grupos hidróxilos en los anillos A y B, así como la saturación en el enlace C2-C3, pueden ser factores importantes que aumentan las actividades citotóxicas o antiproliferativas de los flavonoides (Huang, *et al.* 1994).

La diferencia en la composición de los tejidos de ambos cultivares se observa con el análisis que se realizó por medio de HPLC. Se encontraron un total de 41 compuestos en el cultivar Flor de Junio y 42 en Negro Querétaro (Tabla 7 y 8). Sin embargo no todos los tejidos presentaron los mismos compuestos. La raíz muestra compuestos que absorben a 250 nm (Fig. F4 y G3). La mayoría de los compuestos presentes en las hojas tienen un patrón de absorción a 320 nm (Fig. F1 y G1) mientras que el tallo presenta compuestos que absorben a ambas longitudes de onda (Fig. F2 y G3). Las hojas en etapa R6 son el tejido que presentaron mayor número de compuestos en el cultivar Negro Querétaro. Se encontraron un total de 20 compuestos de los cuales de acuerdo a la mezcla de estándares utilizada se identificaron 6 compuestos: el ácido quínico, hidroxibenzoico, clorogénico, cafeico, cumárico y ferúlico, todos los compuestos encontrados en este tejido absorben a una longitud de onda de 320 nm a excepción del ácido quínico el cual absorbe a 250 nm. Por otra parte el tejido con menos compuestos encontrados se observó en la vaina etapa R8 ya que solo se encontraron 9 compuestos y se identificaron 2: el ácido quínico y el ácido hidroxibenzoico. A diferencia de las hojas los compuestos presentes en este tejido absorben a 250 nm, con lo cual podemos decir que no se tratan de los mismos compuestos. En el cultivar Flor de Junio de los tejidos analizados el tallo en etapa V3 presentó el mayor número de compuestos, un total de 16, identificados 3, el ácido quínico, clorogénico y p- cumárico. Además, el tallo presenta compuestos a ambas longitudes de onda. Como se puede observar la composición de compuestos fenólicos presentes varía no solo entre los tejidos, el perfil entre cultivares también es diferente, lo cual es parte de la estrategia de adaptación de la planta a su medio ambiente, ya que se sabe que a un microorganismo patógeno o a insectos y vertebrados herbívoros les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de metabolitos secundarios que aquellas en las que las mezclas son homogéneas. Las concentraciones de metabolitos secundarios dependen fuertemente de las

condiciones de crecimiento y tienen un impacto en las vías metabólicas responsables de la acumulación de los productos naturales relacionados (Ramakrishna y Ravishankar. 2011). El estrés ambiental como el ataque de patógenos, la radiación UV, las heridas, las deficiencias de nutrientes, la temperatura y el tratamiento con herbicidas a menudo aumentan la acumulación de fenilpropanoides. La exposición a la sequía o el estrés salino causa muchas reacciones comunes en las plantas, entre las que podemos citar la acumulación de metabolitos secundarios. El estrés nutricional también tiene un marcado efecto sobre los niveles fenólicos en los tejidos vegetales, deficiencias en nitrógeno, fósforo, potasio azufre y magnesio influyen directamente en la síntesis de estos compuestos (Dixon y Paiva. 1995). Por lo tanto los metabolitos secundarios confieren protección contra el estrés abiótico. Adicionalmente se ha reportado que los microorganismos de la rizósfera influyen en el perfil de metabolitos secundarios de las plantas. Actualmente se han empleado muchos de estos microorganismos denominados promotores del crecimiento o PGPR por sus siglas en inglés para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios. En nuestro modelo de estudio la presencia del inoculante *Arthrobacter agilis* UMCV2 incrementó en un 50% la concentración de compuestos fenólicos, principalmente en las hojas del cultivar Negro Querétaro en etapa R6 (Fig. 4) y en las vainas en etapa R9 en el cultivar Flor de Junio (Fig. 5). El incremento de los compuestos se confirmó mediante el análisis por HPLC. En las hojas con inóculo del frijol Negro Querétaro en etapa R6 compuestos como el ácido quínico incrementó en un 8% y el ácido cafeico en un 2%. Los compuestos que no se lograron identificar, representados por las señales número 6, 7, 14, 18 y 34 (Tabla 8) presentaron un incremento significativo. Lo anterior nos lleva a pensar que probablemente sean los compuestos responsables de incrementar la actividad antioxidante. El incremento de compuestos fenólicos se reflejó en la actividad antioxidante total de estos tejidos, donde se pudo observar que las hojas en etapa R6 en presencia del inoculante del cultivar Negro Querétaro por los tres métodos analizados tienen mayor capacidad antioxidante que la semilla (Anexo E1). En el caso del cultivar Flor de Junio las vainas en etapa R9 en presencia del inoculante tienen mayor capacidad antioxidante que la semilla (Anexo E2). La actividad antioxidante y citotóxica de los diferentes tejidos de la planta de frijol representan una fuerte alterna a la semilla. Lo cual es una aportación muy importante ya que las vainas en la etapa R9 no se le da ningún uso después de haber retirado la semilla. Por otra parte se podrían retirar las hojas en la etapa R6 para extracción de los compuestos fenólicos sin llegar a evitar el objetivo que es la obtención de la semilla.

## 9.0 CONCLUSIÓN

La planta de frijol es una fuente importante de compuestos fenólicos con potente actividad antioxidante y citotóxica, las cuales además se incrementan con la inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2. Las hojas en etapa R6 y vainas secas representan tejidos alternos a la semilla para la extracción de compuestos fenólicos.

## 10. ADENDUM

### 10.1. Actividad antimicrobiana

Los fenoles también se han caracterizado por su potencial antimicrobiano. Los compuestos fenólicos de las semillas de tres leguminosas *Cicer arietinum* (garbanzo), *Cajanus cajan* (frijol de palo) y *Vigna radiata* (soja verde) fueron probados contra cuatro bacterias diferentes *B. cereus* MTCC 470, *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* JM109 y *P. fluorescens* ost-5. Las bacterias presentaron diferente susceptibilidad frente a cada extracto, efecto que se le puede atribuir al perfil diferencial de compuestos para cada uno. Los extractos de garbanzo y frijol de palo inhibieron completamente el crecimiento de *B. cereus* MTCC 470 a concentraciones de fenoles de 0.1% y 0.2% (Kanatt. *et al.* 2011).

En otro estudio se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de cinco variedades de frijol: Frijol Negro Plus, Negro Zacatecas, Negro Jamapa, Azufrado y Pinto Saltillo, contra las bacterias *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *E. agglomerans*. Los autores concluyen que las tendencias observadas por los extractos son diferentes frente a cada bacteria, sin embargo la mayor actividad antimicrobiana se observó contra *S. typhi* (Ariza Ortega. *et al.* 2013).

El empleo de la semilla ha sido ampliamente explorado sin embargo la leguminosa *Parkia clappertoniana* también mostró efecto antimicrobiano en tejidos diferentes como la raíz, el tallo y las hojas a concentraciones de 5, 10 y 15% de compuestos fenólicos contra tres bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Los extractos presentaron actividad antimicrobiana contra todos los aislados bacterianos (Adeshina. *et al.* 2009).

**10.2 Determinación de actividad antimicrobiana.** Las bacterias que se emplearon son: *Serratia sp.*, *E. coli* QFB, *S. aureus* QFB las cuales se consideran patógenas y *E. coli* pLysS BL21 (DE3) no patogénica. Las bacterias se crecieron en medio líquido por 24 h para posteriormente colocar 100 µL en placas conteniendo medio sólido y sembrarlas en tapete. Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos se colocaron 10 µL de estos extractos en discos de papel filtro. Como control negativo se utilizó metanol al 50% y como control positivo un antibiótico de amplio espectro (amikacina 125 µg/ mL). Una vez colocados los extractos y controles se procedió a incubar las bacterias a 37°C para *E. coli*, *S. aureus* y 25°C para *Serratia sp.*, *E. coli* pLysS BL21 (DE3). Después de 24 h se midieron los halos de inhibición los cuales se reportaron en milímetros.

### 10.3 Resultados de la actividad antimicrobiana.

Los extractos crudos de todos los tejidos muestran diferente capacidad antimicrobiana pero muy similar a la semilla. En la variedad Flor de Junio la raíz sin inóculo en etapa R8 y el germinado con inoculante con 8.1 y 8.0 mm, respectivamente presentan mayor halo de inhibición con *Serratia sp* a diferencia de los demás tejidos. El tallo con inoculante en R8 presenta la menor actividad con 6.5 mm de inhibición. Para *E. coli pLysS BL21 (DE3)* no patogénica los tejidos con mejor inhibición son el germinado en presencia del inoculante seguido por la raíz sin inóculo en etapa R9. El tejido con menor actividad es el tallo con inoculante en etapa R8. Por otra parte para *S. aureus* clínica los extractos control muestran muy poca inhibición, no así para las semillas y las vainas provenientes de las plantas inoculadas ya que muestran la mejor actividad. Las hojas sin inóculo en V3 muestran la menor actividad. Los tejidos de raíz en R6 y las vainas en R9 inoculadas muestran la mejor inhibición contra la bacteria *E. coli* clínica mientras que las hojas control en V3 y el tallo con tratamiento en R8 representan los tejidos con menor inhibición (Tabla 9).

Los milímetros de inhibición en los tejidos del cultivar Negro Querétaro se observan menores a los del cultivar Flor de Junio. En *Serratia sp.* la mejor inhibición se presenta con el germinado inoculado el cual alcanzó un valor de 7.8 mm de inhibición. La raíz sin inoculante en etapa R6 presenta la menor inhibición con 6.2 mm. El tallo en R6 sin inóculo muestra la mejor actividad antimicrobiana. Sin embargo, el germinado en presencia del inoculante presenta valores similares. La raíz sin inoculante en etapa R6 no tiene actividad para *E. coli pLysS BL21 (DE3)*. La bacteria *S. aureus* clínica y *E. coli* clínica muestran mayor resistencia a los extractos probados. Las semillas sin inóculo (R9) con tan solo 7 mm de inhibición son el tejido con mejor actividad seguido de las hojas control en R6 con 6.9 mm. La menor actividad se presenta en la raíz en etapa V3 y las vainas en R8 en presencia del inoculante para *S. aureus* clínica. Las semillas inoculadas presentan la mejor inhibición para *E. coli* clínica con 7.2 mm seguido por el germinado sin inóculo donde se observa una inhibición de 7.1 mm. Por el contrario las hojas y el tallo sin inoculante en etapa R8 presentan la inhibición más baja con tan solo 6.3 mm de inhibición (Tabla 10).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del cultivar Flor de Junio con las diferentes bacterias. Los halos de inhibición se reportan en milímetros. MF ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=12$ , letras denotan diferencias significativas por bacteria.

ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO
		mm de inhibición				mm de inhibición	
		<i>Serratia sp.</i>	<i>Serratia sp.</i>			<i>E. coli pLysS BL21 (DE3)</i>	<i>E. coli pLysS BL21 (DE3)</i>
V0	Germinado	7.5 ± 0.5 abcde	<b>8.0 ± 0.5 a</b>	V0	Germinado	7.1 ± 0.5 abcde	<b>7.7 ± 0.4 a</b>
V3	Raíz	6.9 ± 0.8 cdefg	6.8 ± 0.4 degh	V3	Raíz	7.0 ± 1.1 abcdef	6.7 ± 0.3 cdef
	Tallo	7.0 ± 0.6 bcdefg	6.7 ± 0.4 efg		Tallo	7.4 ± 0.9 abcd	6.7 ± 0.5 cdef
	Hojas	6.9 ± 0.3 cdefg	6.8 ± 0.5 cefg		Hojas	7.1 ± 0.3 abcdef	7.0 ± 0.4 abcdef
R6	Raíz	7.3 ± 0.6 abcdef	7.4 ± 0.6 abcdef	R6	Raíz	7.5 ± 0.9 abc	7.3 ± 0.6 abcd
	Tallo	7.5 ± 0.8 abcdef	7.3 ± 0.5 abcdefg		Tallo	6.6 ± 0.5 def	6.4 ± 0.6 ef
	Hojas	7.4 ± 0.4 abcdef	7.3 ± 0.5 abcdefg		Hojas	7.1 ± 0.8 abcdef	7.2 ± 0.5 abcde
R8	Raíz	<b>8.1 ± 0.7 a</b>	6.7 ± 0.7 fg	R8	Raíz	7.4 ± 0.2 abcd	7.2 ± 0.3 abcde
	Tallo	7.9 ± 0.4 ab	<b>6.5 ± 0.4 g</b>		Tallo	7.3 ± 0.5 abcde	<b>6.3 ± 0.5 f</b>
	Hojas	7.4 ± 0.7 abcdefg	7.7 ± 0.5 abd		Hojas	7.1 ± 0.6 abcdef	7.1 ± 0.5 abcde
	Vainas	7.9 ± 0.6 ab	7.1 ± 0.4 bcdefg		Vainas	7.6 ± 0.7 abc	7.0 ± 0.3 abcdef
R9	Raíz	7.7 ± 0.6 abcd	6.9 ± 0.4 cdefg	R9	Raíz	7.7 ± 0.6 ab	6.8 ± 0.3 bcdef
	Tallo	7.6 ± 0.8 abcdef	7.0 ± 0.5 bcdefg		Tallo	7.5 ± 0.7 abc	7.1 ± 0.5 abcdef
	Hojas	7.4 ± 0.8 abcdef	7.2 ± 0.4 abcdefg		Hojas	7.1 ± 0.5 abcdef	7.6 ± 0.5 abc
	Vainas	6.8 ± 0.3 cdefg	7.3 ± 0.4 abcdefg		Vainas	7.0 ± 0.0 abcdef	7.4 ± 0.4 abcd
	Semillas	7.2 ± 0.3 abcdefg	7.7 ± 0.4 abd		Semillas	7.0 ± 0.0 abcdef	7.1 ± 0.4 abcdef
ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO
		mm de inhibición				mm de inhibición	
		<i>S. aureus QFB</i>	<i>S. aureus QFB</i>			<i>E. coli QFB</i>	<i>E. coli QFB</i>
V0	Germinado	6.7 ± 0.5 bcdef	6.7 ± 0.5 bcdef	V0	Germinado	6.5 ± 0.6 bc	6.9 ± 0.6 abc
V3	Raíz	6.6 ± 0.5 bcdefg	6.2 ± 0.3 fg	V3	Raíz	6.9 ± 0.8 abc	6.8 ± 0.6 abc
	Tallo	6.4 ± 0.6 cdefg	6.3 ± 0.3 fg		Tallo	6.6 ± 0.6 bc	6.8 ± 0.3 abc
	Hojas	<b>6.0 ± 0 g</b>	6.5 ± 0.5 cdefg		Hojas	<b>6.3 ± 0.4 c</b>	7.2 ± 0.4 ab
R6	Raíz	6.9 ± 0.5 bcde	7.2 ± 0.2 ab	R6	Raíz	6.5 ± 0.6 bc	<b>7.4 ± 0.6 a</b>
	Tallo	6.4 ± 0.4 cdefg	6.3 ± 0.5 efg		Tallo	6.9 ± 0.4 abc	6.9 ± 0.4 abc
	Hojas	6.7 ± 0.3 bcdefg	7.0 ± 0.4 abc		Hojas	6.7 ± 0.3 abc	6.8 ± 0.3 abc
R8	Raíz	6.5 ± 0.4 cdefg	6.6 ± 0.2 bcdefg	R8	Raíz	6.7 ± 0.8 abc	6.6 ± 0.2 bc
	Tallo	6.3 ± 0.4 defg	6.5 ± 0.0 cdefg		Tallo	6.4 ± 0.5 bc	<b>6.3 ± 0.2 c</b>
	Hojas	6.2 ± 0.3 fg	6.8 ± 0.3 bcdef		Hojas	6.8 ± 0.3 abc	6.5 ± 0.4 bc
	Vainas	6.7 ± 0.4 bcdefg	6.7 ± 0.3 bcdef		Vainas	6.7 ± 0.5 abc	6.9 ± 0.2 abc
R9	Raíz	6.4 ± 0.5 cdefg	6.6 ± 0.2 bcdefg	R9	Raíz	7.2 ± 0.8 ab	6.9 ± 0.2 abc
	Tallo	6.4 ± 0.4 cdefg	6.9 ± 0.3 bcde		Tallo	6.9 ± 0.4 abc	7.0 ± 0.4 abc
	Hojas	6.7 ± 0.3 bcdefg	6.9 ± 0.3 abcd		Hojas	6.8 ± 0.2 abc	7.2 ± 0.4 ab
	Vainas	6.8 ± 0.3 bcdef	<b>7.6 ± 0.8 a</b>		Vainas	6.9 ± 0.3 abc	<b>7.4 ± 0.5 a</b>
	Semillas	7.1 ± 0.2 abc	<b>7.6 ± 0.4 a</b>		Semillas	6.8 ± 0.3 abc	7.2 ± 0.4 ab

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del cultivar Negro Querétaro con las diferentes bacterias. Los halos de inhibición se reportan en milímetros. MF ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ , n=12, letras denotan diferencias significativas por bacteria.

ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO
		mm de inhibición				mm de inhibición	
		<i>Serratia sp.</i>	<i>Serratia sp.</i>			<i>E. coli pLysS BL21 (DE3)</i>	<i>E. coli pLysS BL21 (DE3)</i>
V0	Germinado	7.1 ± 0.3 abcd	<b>7.8 ± 1.0 a</b>	V0	Germinado	7.2 ± 0.4 abc	<b>7.4 ± 0.6 ab</b>
V3	Raíz	7.3 ± 0.9 abc	6.7 ± 0.3 bcd	V3	Raíz	7.0 ± 0.7 abc	7.3 ± 1.1 ab
	Tallo	7.3 ± 1.2 abc	7.1 ± 0.6 abcd		Tallo	<b>7.5 ± 0.9 a</b>	6.8 ± 0.4 abcd
	Hojas	7.4 ± 0.6 abc	7.4 ± 0.7 abc		Hojas	7.2 ± 0.5 abc	7.4 ± 0.2 ab
R6	Raíz	<b>6.2 ± 0.2 d</b>	7.0 ± 1.2 abcd	R6	Raíz	<b>6.0 ± 0.1 d</b>	7.1 ± 1.0 abc
	Tallo	7.6 ± 0.5 ab	7.1 ± 0.7 abcd		Tallo	7.3 ± 0.4 ab	6.7 ± 0.4 abcd
	Hojas	7.4 ± 0.5 abc	6.7 ± 0.7 abcd		Hojas	7.0 ± 1.0 abc	6.3 ± 0.4 cd
R8	Raíz	7.2 ± 0.4 abc	6.8 ± 0.3 abcd	R8	Raíz	7.0 ± 0.4 abc	6.7 ± 0.5 abcd
	Tallo	6.8 ± 0.6 bcd	6.7 ± 0.4 abcd		Tallo	6.6 ± 0.4 bcd	6.8 ± 0.4 abcd
	Hojas	7.1 ± 0.6 abc	6.9 ± 0.8 abcd		Hojas	6.9 ± 0.4 abc	6.7 ± 0.6 abcd
	Vainas	7.5 ± 0.6 ab	6.4 ± 0.4 cd		Vainas	6.8 ± 0.3 abcd	6.6 ± 0.5 abcd
R9	Raíz	7.0 ± 0.4 abcd	6.7 ± 0.3 abcd	R9	Raíz	6.9 ± 0.2 abc	7.0 ± 0.0 abc
	Tallo	7.4 ± 0.4 abc	6.8 ± 0.3 abcd		Tallo	6.7 ± 0.7 abcd	6.8 ± 0.3 abcd
	Hojas	7.1 ± 0.4 abcd	6.7 ± 0.4 bcd		Hojas	6.7 ± 0.7 abcd	6.9 ± 0.2 abc
	Vainas	7.1 ± 0.4 abcd	6.6 ± 0.3 bcd		Vainas	6.8 ± 0.4 abcd	7.1 ± 0.5 abc
	Semillas	7.4 ± 0.5 ab	7.0 ± 0.4 abcd		Semillas	7.2 ± 0.5 abc	7.3 ± 0.5 ab
ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO	ETAPA	TEJIDO	SIN INÓCULO	CON INÓCULO
		mm de inhibición				mm de inhibición	
		<i>S. aureus QFB</i>	<i>S. aureus QFB</i>			<i>E. coli QFB</i>	<i>E. coli QFB</i>
V0	Germinado	6.7 ± 0.3 abc	6.3 ± 0.4 abc	V0	Germinado	7.1 ± 0.2 ab	6.9 ± 0.7 abcd
V3	Raíz	6.4 ± 0.6 abc	<b>6.1 ± 0.2 c</b>	V3	Raíz	6.7 ± 0.7 abcd	6.4 ± 0.5 bcd
	Tallo	6.3 ± 0.4 abc	6.3 ± 0.5 abc		Tallo	6.7 ± 0.8 abcd	7.0 ± 0.4 abc
	Hojas	6.6 ± 0.9 abc	6.4 ± 0.4 abc		Hojas	6.6 ± 0.4 abcd	6.4 ± 0.5 bcd
R6	Raíz	6.2 ± 0.3 bc	6.8 ± 0.8 abc	R6	Raíz	6.5 ± 0.0 bcd	6.9 ± 0.4 abcd
	Tallo	6.4 ± 0.6 abc	6.6 ± 0.2 abc		Tallo	6.8 ± 0.4 abcd	6.5 ± 0.4 abcd
	Hojas	<b>6.9 ± 0.7 a</b>	6.5 ± 0.4 abc		Hojas	6.8 ± 0.6 abcd	6.4 ± 0.5 bcd
R8	Raíz	6.7 ± 0.4 abc	6.5 ± 0.3 abc	R8	Raíz	6.6 ± 0.5 abcd	6.5 ± 0.0 abcd
	Tallo	6.6 ± 0.5 abc	6.4 ± 0.3 abc		Tallo	<b>6.3 ± 0.4 d</b>	6.5 ± 0.3 abcd
	Hojas	6.6 ± 0.6 abc	6.5 ± 0.3 abc		Hojas	<b>6.3 ± 0.4 d</b>	6.3 ± 0.3 cd
	Vainas	6.6 ± 0.5 abc	<b>6.1 ± 0.2 c</b>		Vainas	6.6 ± 0.6 abcd	6.4 ± 0.2 bcd
R9	Raíz	6.7 ± 0.4 abc	6.6 ± 0.2 abc	R9	Raíz	6.8 ± 0.3 abcd	6.7 ± 0.3 abcd
	Tallo	6.7 ± 0.3 abc	6.5 ± 0.0 abc		Tallo	6.8 ± 0.3 abcd	6.7 ± 0.3 abcd
	Hojas	6.7 ± 0.3 abc	6.5 ± 0.0 abc		Hojas	6.5 ± 0.3 abcd	6.6 ± 0.2 abcd
	Vainas	6.9 ± 0.2 ab	6.6 ± 0.2 abc		Vainas	6.7 ± 0.3 abcd	6.7 ± 0.3 abcd
	Semillas	<b>7.0 ± 0.4 a</b>	6.9 ± 0.2 ab		Semillas	6.7 ± 0.3 abcd	<b>7.2 ± 0.6 a</b>

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Adebamowo C.A, Cho E., Sampson L., Katan M.B., Spiegelman D., Willett W.C. y Holmes M.D. (2005). Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *International Journal of Cancer* (114). pp: 628–633.
- Adeshina G., Onujagbe O. y Onaolapo J. (2009). Comparative Antibacterial Studies On The Root, Stem Bark And Leaf Extracts OfParkia Clappertoniana. *The Internet Journal of Alternative Medicine*. 2(8). pp: 1-7.
- Alam M. N., Bristi N. J. y Rafiquzzaman M. (2013). Review on in Vivo and in Vitro Methods Evaluation of Antioxidant Activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21(2). pp: 143-152.
- Alvidrez Morales A., González Martínez B. E. y Jiménez Salas Z. (2002). Tendencias en la Producción de Alimentos: Alimentos Funcionales. *Revista de Salud Pública y Nutrición* 3(3). pp: 1-6.
- Ariza Ortega T. de J., Berber Aceves G. E., Sotelo Ramírez Ma. G. y Yáñez Fernández J. (2013). Methanolic extracts antioxidant and antimicrobial activities from five varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *International Journal of Engineering Research & Technology* 11(2). pp: 3196-3201.
- Avello M. y Suwalsky M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea* 494. pp: 161-172.
- Bisby F. 1994. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. Chapman & Hall Chemical Database. pp: 20-34.
- Cámara, C.R.S., Urrea C.A. y Schlegel V. (2013). Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris L.*) as a Functional Food: Implications on Human Health. *Agriculture*. 3. pp: 90-111.
- Davila M. A., Sangronis E. y Granito M. (2015). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 4(53). Disponible en: <file:///D:/PROYECTO%20DE%20MAESTRIA/Presentaci%C3%B3n%20seminario%201/Leguminosas%20germinadas%20o%20fermentadas%20alimentos%20o%20ingredientes%20de%20alimentos%20funcionales.html>

- De la Rosa Mera C. J. (2009). Micorriza Arbuscular y Estrés Abiótico en el contenido de Alcaloides (Vinblastina y Vincristina) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tesis de Maestría. pp: 15-98.
- Díaz-Batalla L., Widholm J. M., Fahey G. C., Castaño-Tostado E. y Paredes-López O. (2006). Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultural and Food Chemistry* (54). pp: 2045-2052
- Dixon R. A. y Paiva N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* (7). pp: 1085-1097.
- Espinosa Alonso L. G. (2006). Diversidad Genética y Caracterización Nutricional y Nutracéutica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado. pp: 18-42.
- Fang M., Lee S. Y., Park S. M., Choi K. C., Lee Y. J., Cho H. K., Cho S. W., Whang W. K. y Lee J. C. (2011). Anti-inflammatory potential of *Phaseolus calcaratus* Roxburgh, an oriental medicine on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63(1). pp: 120-128.
- Freshney R. I. 2002. Cytotoxicity. *Culture of animal cells*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. p: 513.
- García Juárez P., Altamirano Hernández J., López Bucio J., Valencia Cantero E. y Macías Rodríguez L. (2010). Efecto del Perfil de Compuestos Volátiles de Distintas Rizobacterias en el Crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. *Biológicas* 12(1). Pp: 20-27.
- Guajardo-Flores D., Serna- Saldívar S. O. y Gutiérrez-Urbe J. A. (2013). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* (141). pp: 1497-1503.
- Guzmán Maldonado S. H., Acosta Gallegos J. A., Álvarez Muñoz Ma. A., García Delgado S., Loarca Piña G. (2002). Calidad Alimentaria y Potencial Nutracético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México*. 2(28). pp 159-173.

- González Rayo H. (2014). Efecto de Diferentes Inoculantes Microbianos Sobre el Rendimiento del Cultivo y Contenido de Compuestos Fenólicos en la Semilla de Frijol. Tesis de Licenciatura. pp: 37-52.
- Hammerstone J.F., Lazarus S.A. y Schmitz H.H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The Journal of Nutrition* 8(30). pp: 2086S–2092S.
- Harborne J. B. y Dey P. M. 1980. *Methods in Plant Biochemistry*. Plants Phenolics volume 1. Edit. Academic Press.
- Huang H. C., Wang H. R. y Hsieh L.M. (1994). Antiproliferative Effect of Baicalein, a Flavonoid from a Chinese Herb, on Vascular Smooth Muscle Cell. *European Journal of Pharmacology* (251). pp: 91-93.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. y Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* (13). pp: 572–584.
- Kanatt S. R., Arjun K. y Sharma A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Research International* (44). pp: 3182-3187.
- Lavola A. (1998). Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiology* (18). pp: 53–58.
- Liu R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition* (134). pp: 3479S–3485S.
- Liu R. H. (2013). Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *Journal of Food Science* S1 (78). pp: A18-A25.
- Lomas Soria Ma. C. (2008). Efecto del Consumo de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) cocido sobre citosinas proinflamatorias relacionadas con daño renal en ratas diabéticas. *Tesis de Maestría*. pp: 38-105.
- López Serrano M. y Cañellas García C. (2012). Manual de Plantas Medicinales para Guinea Ecuatorial. *Fundación de Religiosos para la Salud (FRS) y Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)*. pp: 7-11.

- López A., El-Naggar T., Dueñas M., Ortega T., Estrella I., Hernández T., Gómez-Serranillos M<sup>a</sup> P., Palomino O. M<sup>a</sup>. y Carretero M<sup>a</sup> E. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* (138). pp: 547-555.
- Martínez C., Yáñez J., Rodríguez J., Canteras M., Alcaraz M. y Vicente V. (2001). Inhibición del Crecimiento de la Línea de Melanoma Murino B16F10 por Diferentes Compuestos Polifenólicos. *Revista Española de Patología* 4(34). pp: 317-324.
- Mercado-Mercado G., De la rosa Carrillo L., Wall-Medrano A., López Díaz J.A. y Álvarez-Parrilla E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria* 28 (1). pp: 36-46.
- Mirzaei A., Mirzaei N. y Ghavamizadeh M. (2013). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: a Brine Shrimp Lethality Test. *Life Science Journal* 10(12). pp: 8-12.
- Moreno Arreola E., Cárdenas Rodríguez N., Coballase Urrutia E., Pedraza Chaverri J., Carmona Aparicio L. y Ortega Cuellar D. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A Useful Model for Studying Metabolic Disorders in Which Oxidative Stress Is a Contributing Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. pp: 1-9.
- Martínez Flórez S., González Gallego J., Culebras J. M. y Tuñón M.<sup>a</sup> J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria XVII* (6). pp: 271-278.
- Montejano Mayo W., Valencia Cantero E., López Albarrán P. y Velázquez Becerra C. (2016). Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre la Germinación y Crecimiento de *Pinus devoniana* lindley. *Polibotánica* (41). pp: 79-90.
- Murtaugh M.A., Sweeney C., Giuliano A.R., Herrick J.S., Hines L., Byers T., Baumgartner K.B. y Slattery M.L. (2008). Diet patterns and breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women: the Four-Corners Breast Cancer Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* (87). pp: 978–984.

- Orozco Mosqueda Ma. Del C., Velázquez Becerra C., Macías Rodríguez L. I., Santoyo G., Flores Cortez I., Alfaro Cuevas R. y Valencia Cantero E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 Induces Iron Acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro Via Dimethylhexadecylamine Emission. *Plant soil* (362). pp: 51-66.
- Oliveros-Bastidas A. de J., Macías F. A., Carrera Fernández C., Marín D. y Molinillo J. M. G. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova* 32(1). pp: 198-213.
- Ozyigit I.I. (2008). Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *African Journal of Biotechnology* 8(7). pp: 1145-1150.
- Pandey K. B. y Rizvi S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5). pp: 270–278.
- Quinto C. y Cárdenas L. (2014). Diálogo para ganar: interacción simbiótica para entre una bacteria del suelo y el frijol. *Biotecnología*. 14(3). Pp: 273-280.
- Ramakrishna A. y Ravishankar G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 11(6). pp: 1720-1731.
- Ratty A.K. y Das N.P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* (39). pp: 69–79.
- Reyes-Martínez A., Almaraz-Abarca N., Gallardo-Velázquez T., González Elizondoa Ma. del S., Herrera-Arrieta Y., Pajarito-Raveleroc A., Alanís-Bañuelos R. E. y Torres-Moránd M. I. (2014). Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. pp: 1-6.
- Reynoso Camacho, R. (2007). El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura técnica en México*, 33(1). pp: 43-52.

- Roberfroid M. B. (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71(6). pp: 1660s-1664s.
- Soriano Bello E. L. (2006). El Uso del Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.) Como Planta Medicinal. Tesina de Diplomado Tlahui-Medic. I (21). Medicina Tradicional de México y sus Plantas Medicinales. Disponible en: <http://www.tlahui.com/medic/medic21/frijol.htm>
- Sepúlveda Jiménez G., Porta Ducoing H. y Rocha Sosa M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3(21). pp: 355-363.
- Scalbert A., Manach C., MoranD C. y Rémésy C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Food Science and Nutrition* (45). pp: 287-306.
- Shetty K., Curtis O. F., Levin R. E., WitkowskY R. y Woraluk A. (1995). Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology* (147). pp: 447-451.
- Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs, D. R. y Marquart, L. (1999). Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *The American Journal of Clinical Nutrition* 3(70). pp: 459-463.
- Suárez Martínez S. E. (2014). *Phaseolus* y salud: Más allá del frijol como alimento. Tesis de Maestría. pp: 14-33.
- Sekar S. y Kandavel D. (2010). Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants– New Avenues for Phytochemicals. *Journal of Phytology* 2(7). pp: 91-100.
- Sorgeloos P., Lavens P., Lé P., Tackaert W. y Versichele D. (1986). *Manual para el Cultivo y Uso de Artemia en Acuicultura. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia.*

- Tao Y., Hyo Min A., Ting S., Keejung Y., Hyun-Jae J., Yong Jin L., Hyun Mo Y., Jae Hun K., Changhyuk K., Moon Hi H., Sang-hun C., Tae Wong K., Sun Young K., Jaehwi L. y Jae Youl C. (2011). Anti-inflammatory activity of ethanol extract derived from *Phaseolus angularis* beans. *Journal of Ethnopharmacology* (137). pp: 1197-1206.
- Thompson M. D., Mensack M.M., Jiang W., Zhu Z., Lewis M. R., McGinley J. N., Brick M. A y Thompson H. J. (2012). Cell signaling pathways associated with a reduction in mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Carcinogenesis* 1(33). pp.226–232
- Ulloa J. A., Rosas Ulloa P., Ramírez Ramírez J. C. y Ulloa Rangel B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente* 8. pp: 5-9.
- Vargas Ávila Y. R. y Villamil Lozano O. E. (2012). Caracterización Físicoquímica y Nutricional de la Harina de Frijol caupí (*vigna unguiculata* l.) Cultivado en el Departamento del Tolima. Tesis de Licenciatura.
- Valencia Cantero E., Hernández Calderón E., Velázquez Becerra C., López Meza J. E., Alfaro Cuevas R. y López Bucio J. (2007). Role of Dissimilatory Fermentative Iron-reducing Bacteria in Fe Uptake by Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Plants Grown in Alkaline Soil. *Plant Soil* (291). pp: 263–273.
- Valares Masa C. (2011). Variación del Metabolismo Secundario en Plantas debida al Genotipo y al Ambiente. Tesis de Doctorado.
- Venkateswaran S. y Pari L. (2002). Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 11 (3). pp: 206-209.
- Zia-ul-haq M., Nisar M., Shah M.R., Akhter2 M., Qayum M., Ahmad S., Shahid S. A. and Hasanuzzaman M. (2011). Toxicological screening of some selected legumes seed extracts. *Legume Research* 4(34). pp: 242-250

## ANEXO A. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

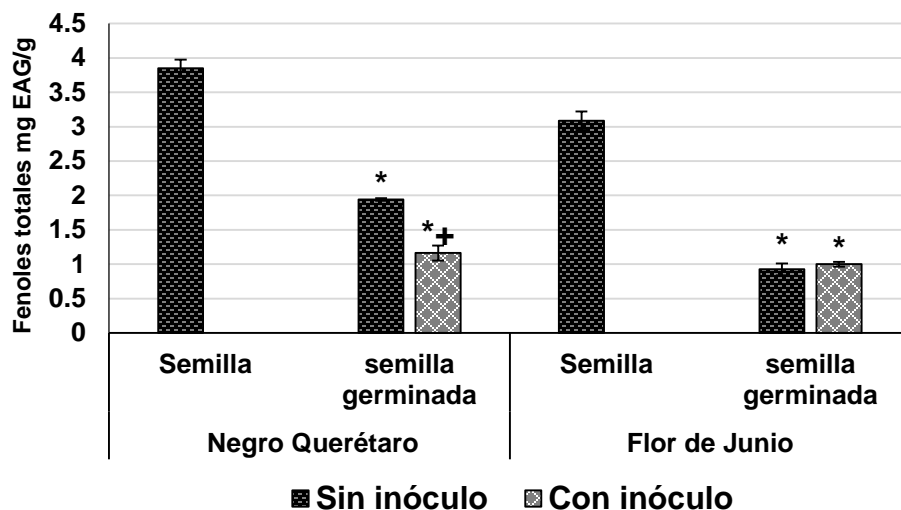


Figura A1. Contenido de fenoles totales en etapa V0. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

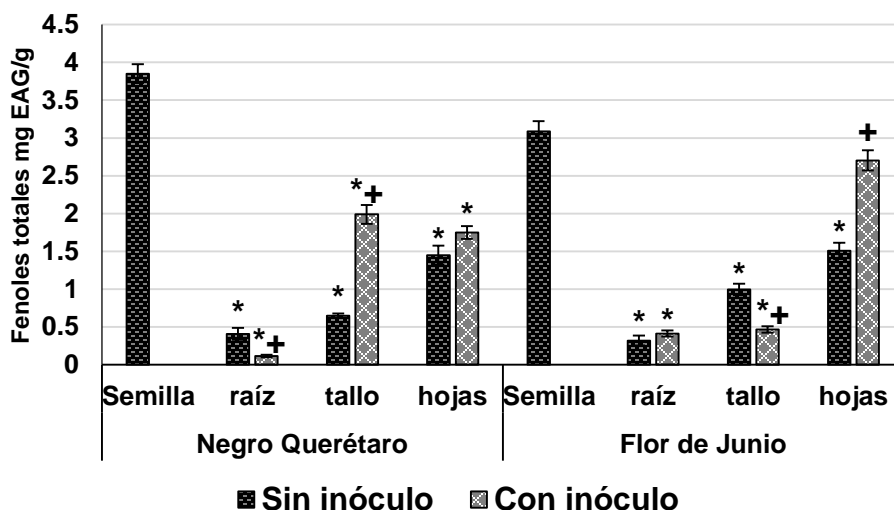


Figura A2. Contenido de fenoles totales en etapa V3. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

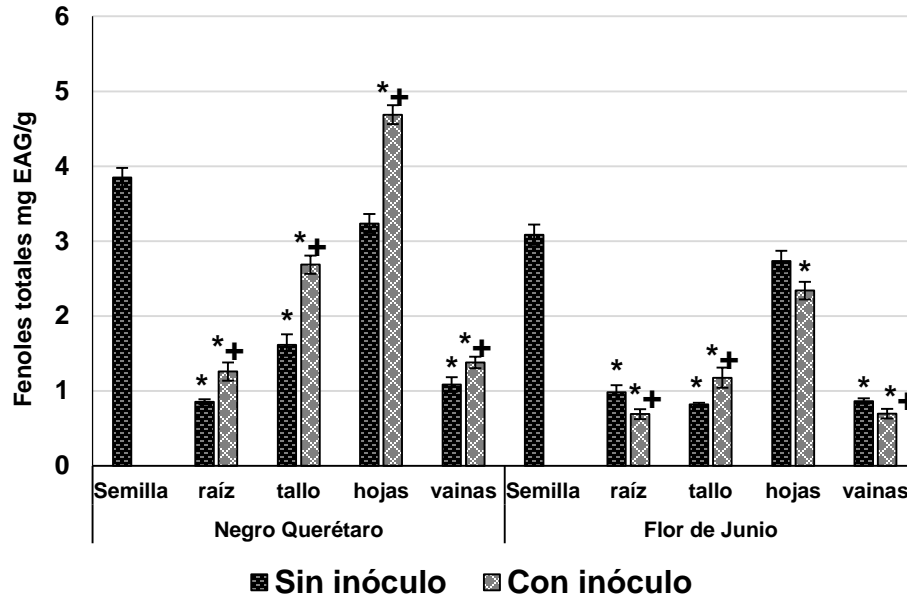


Figura A3. Etapa R8. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

## ANEXO B. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS

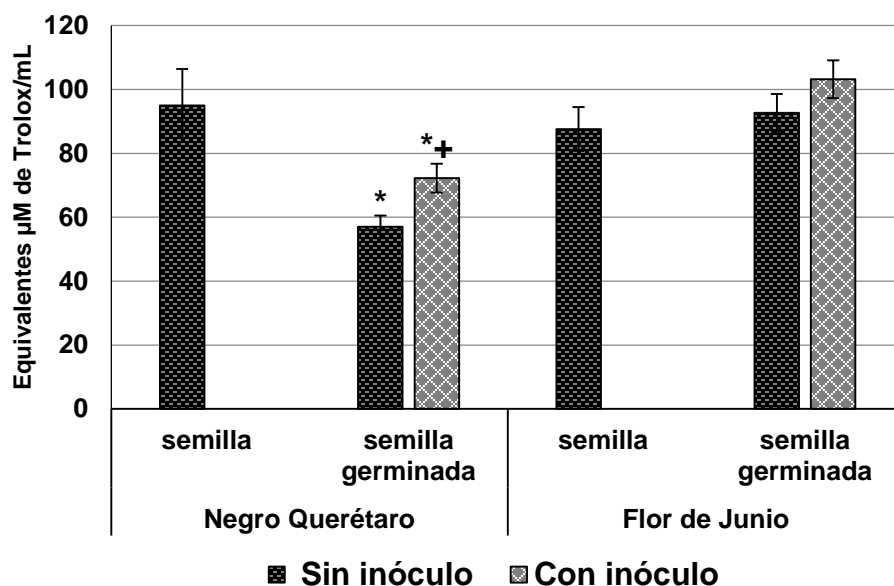


Figura B1. Etapa V0. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

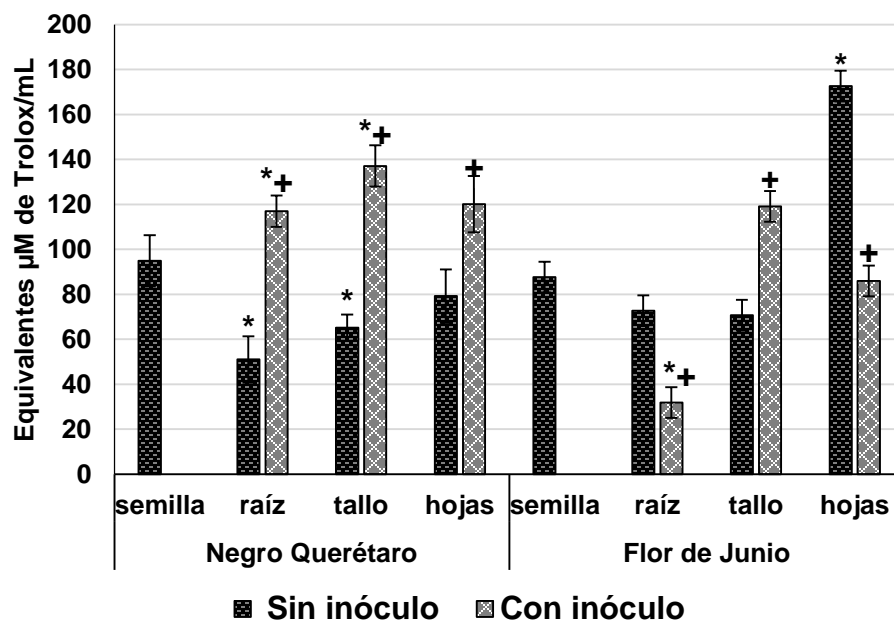


Figura B2. Actividad de los tejidos en etapa V3. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

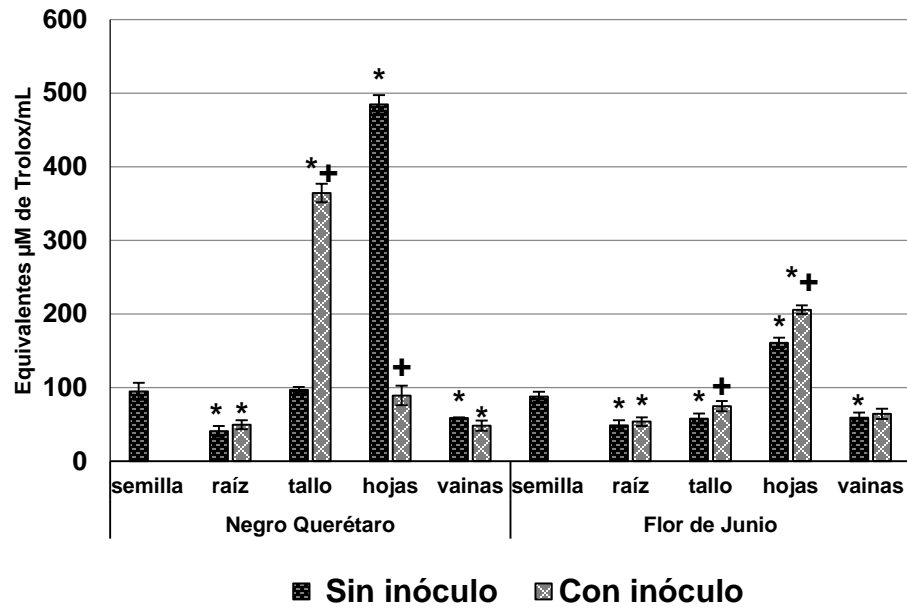


Figura B3. Actividad de los tejidos en etapa R8 Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

## ANEXO C. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH

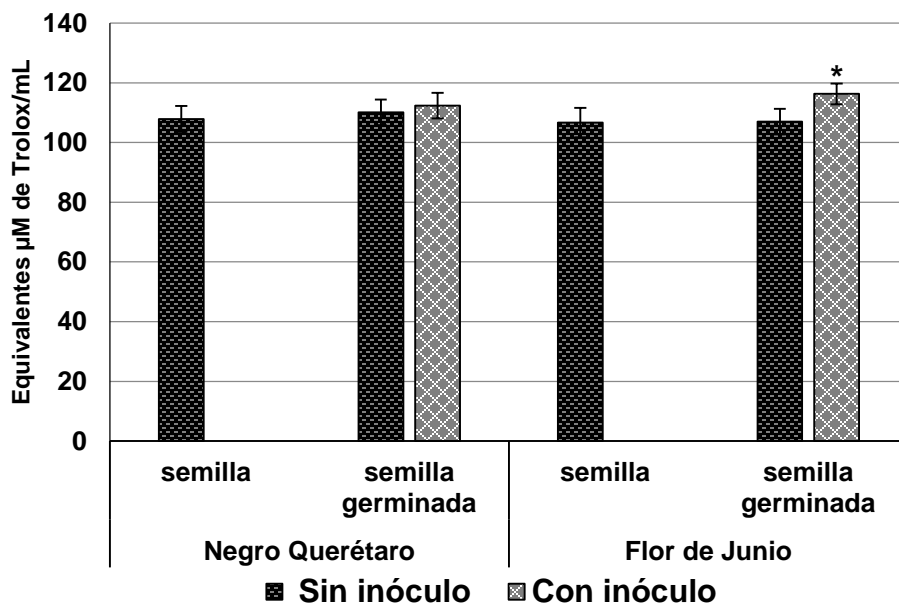


Figura C1. Etapa V0 en el cultivar Flor de Junio. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

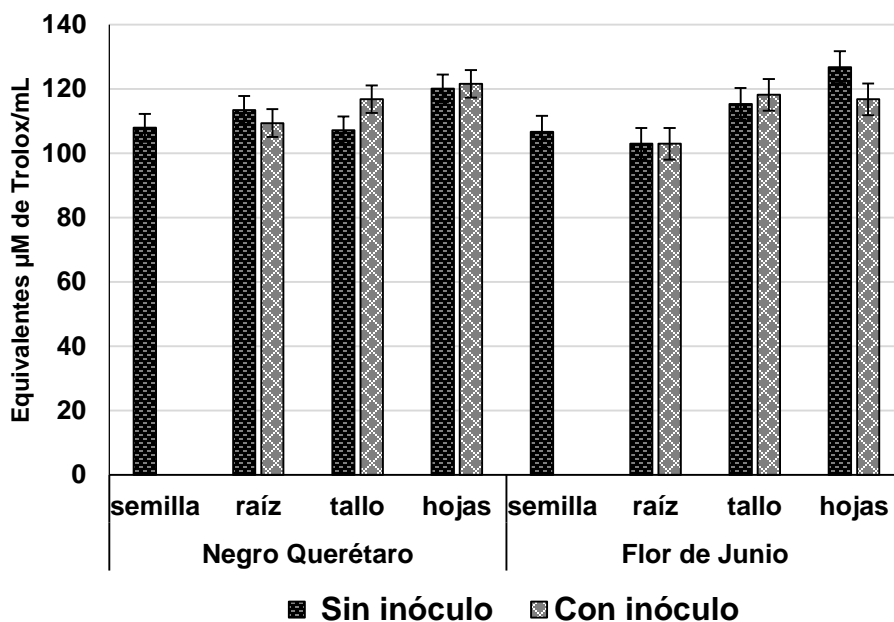


Figura C2. La Capacidad antioxidante de todos los tejidos en etapa V3. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

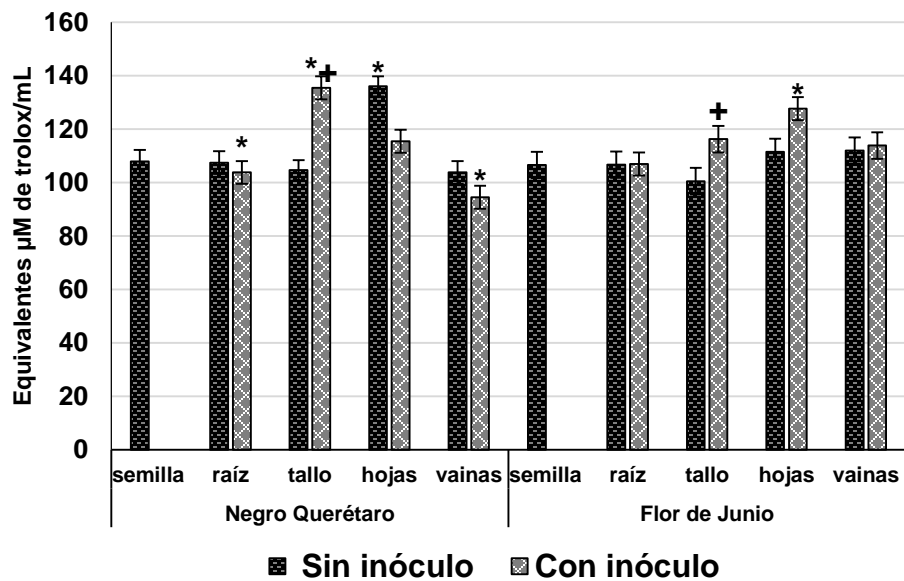


Figura C3. La Capacidad antioxidante etapa R8. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

## ANEXO D. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE FRAP

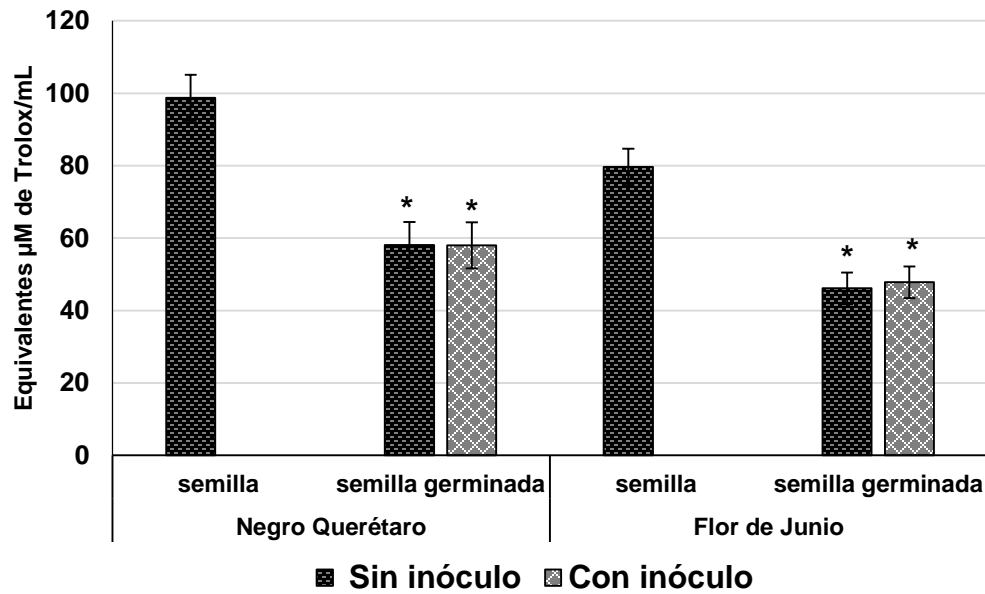


Figura D1. Etapa V0. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

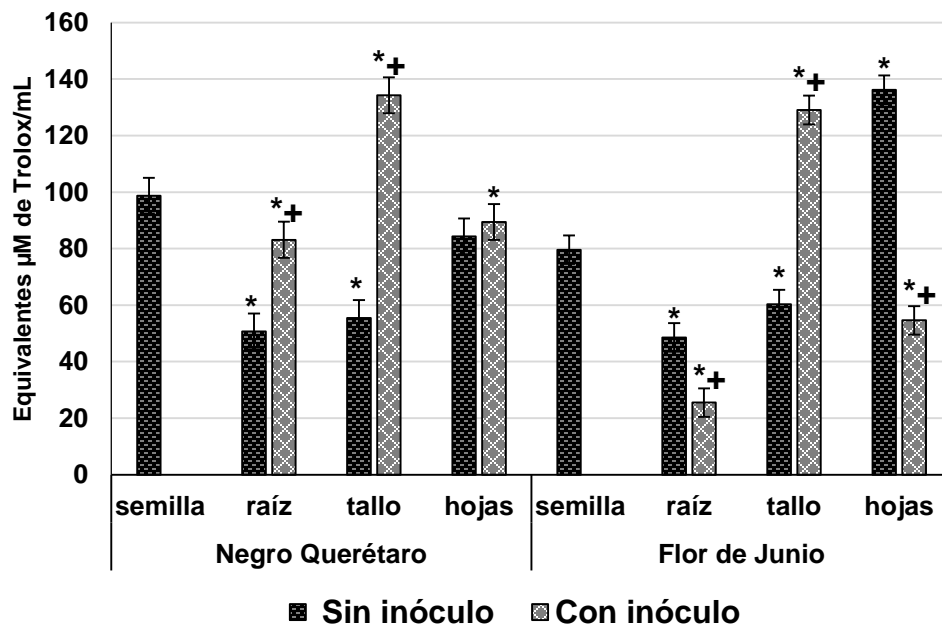


Figura D2. La Capacidad antioxidante etapa V3. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

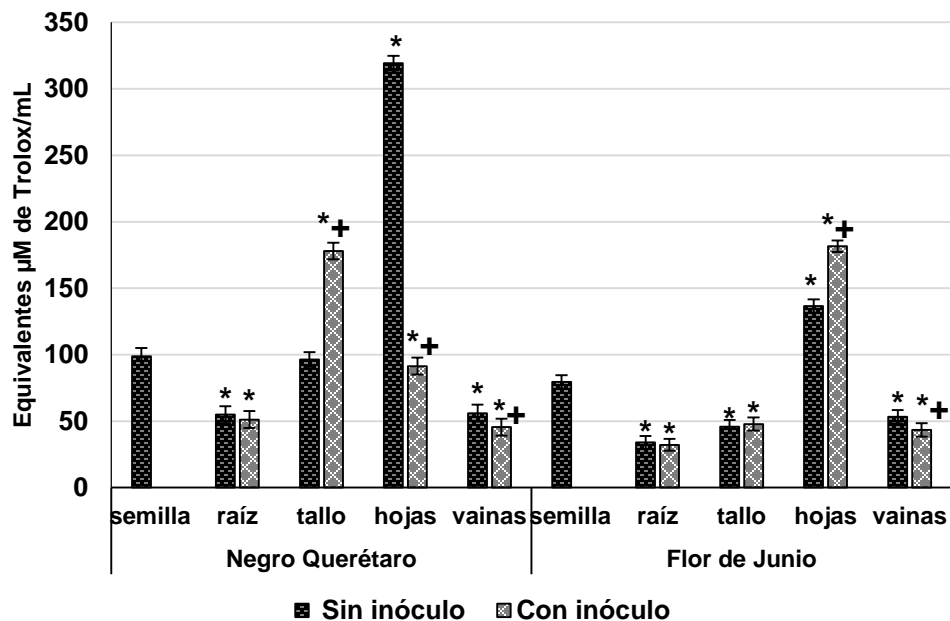


Figura D3. La Capacidad antioxidante etapa R8. Tukey  $\alpha=0.05$ ,  $n=4$ ; barra= SD, \* denota diferencias significativas por cultivar con respecto a la semilla, + denota diferencias significativas entre tejidos respecto al inóculo por cultivar.

## ANEXO E. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN TEJIDOS DE LOS CULTIVARES.

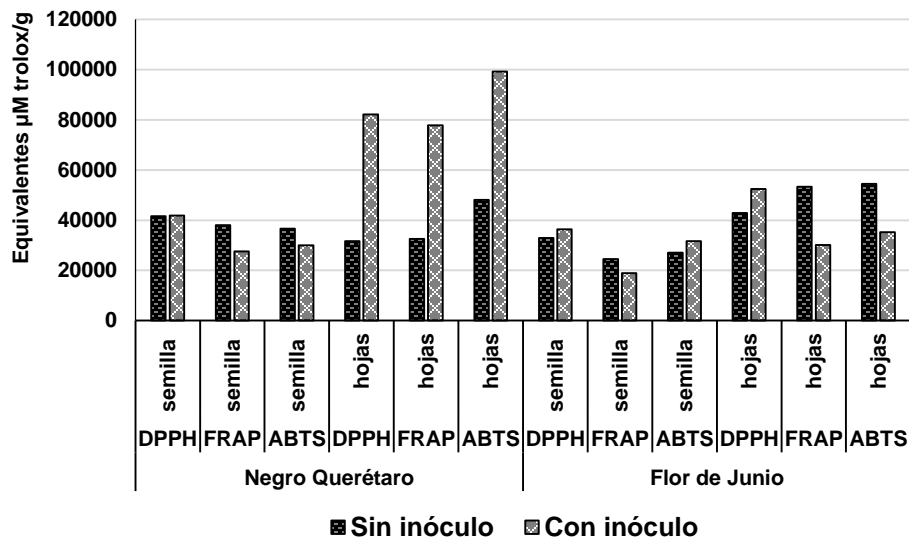


Figura E1. Actividad antioxidante total de las hojas en etapa R6.

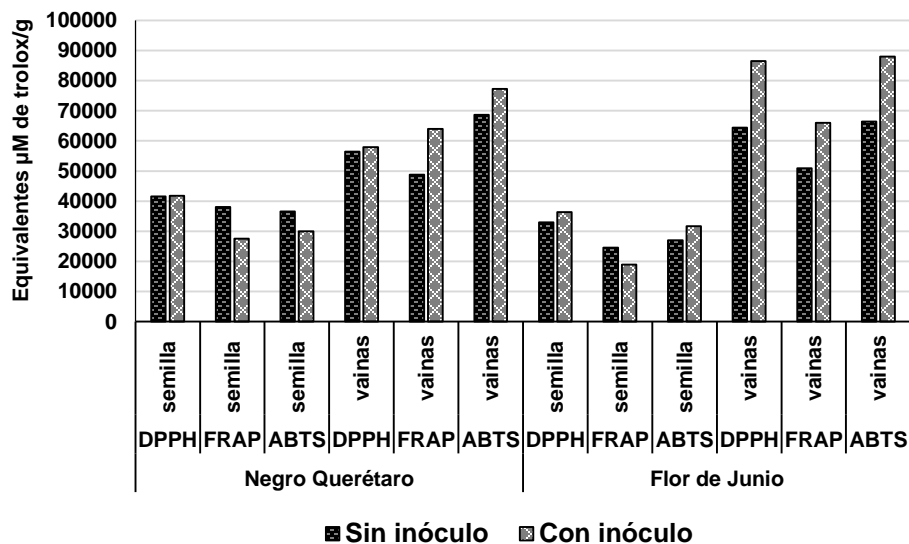


Figura E2. Actividad antioxidante total de las vainas en etapa R9.

## ANEXO F. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN EL CULTIVAR NEGRO QUERÉTARO

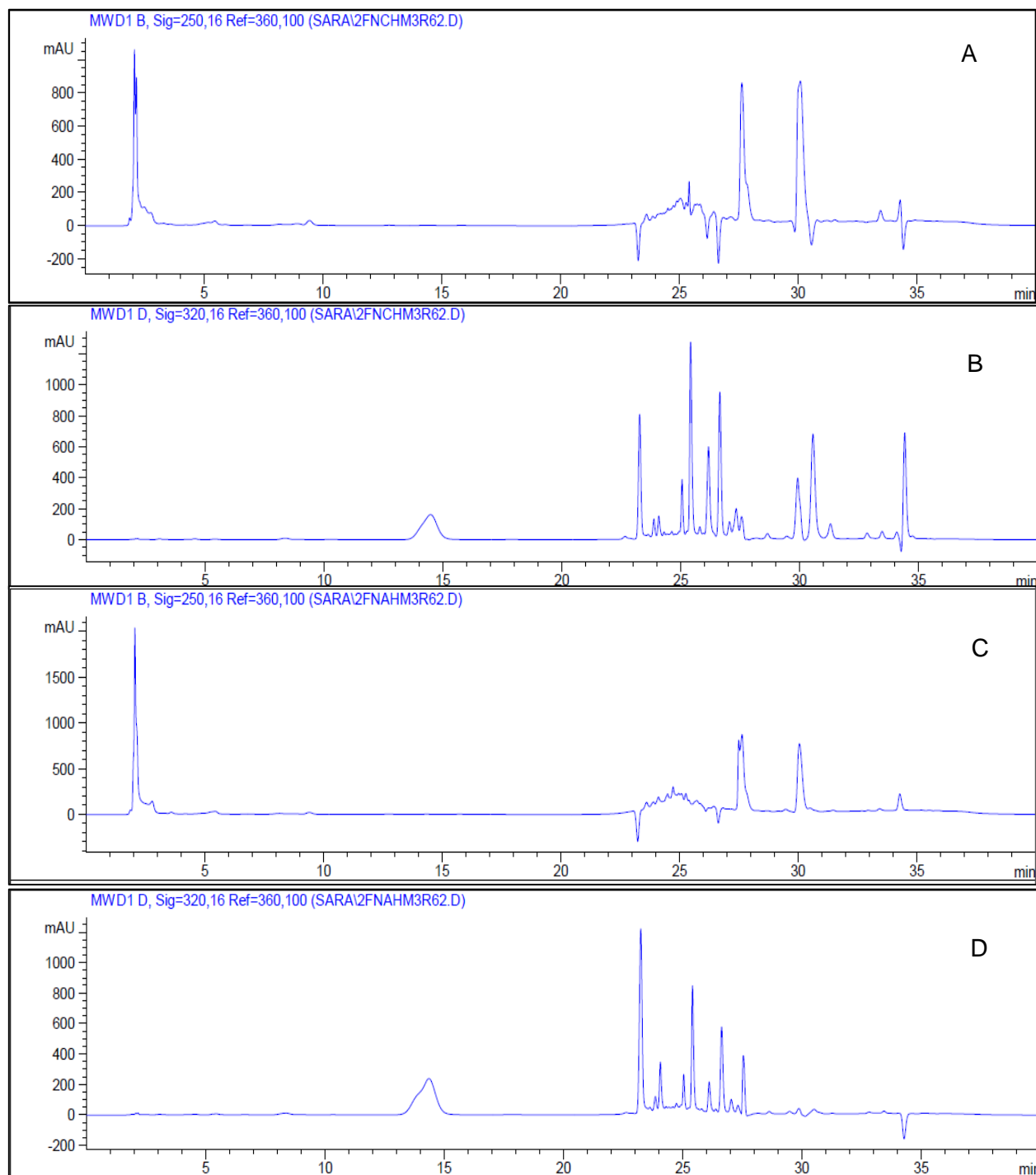


Figura F1. Cromatogramas de las hojas en etapa R6 del cultivar Negro Querétaro. A) Hojas sin inóculo a 250 nm. B) Hojas sin inóculo a 320 nm. C) Hojas con inóculo a 250 nm. D) Hojas con inóculo a 320 nm.

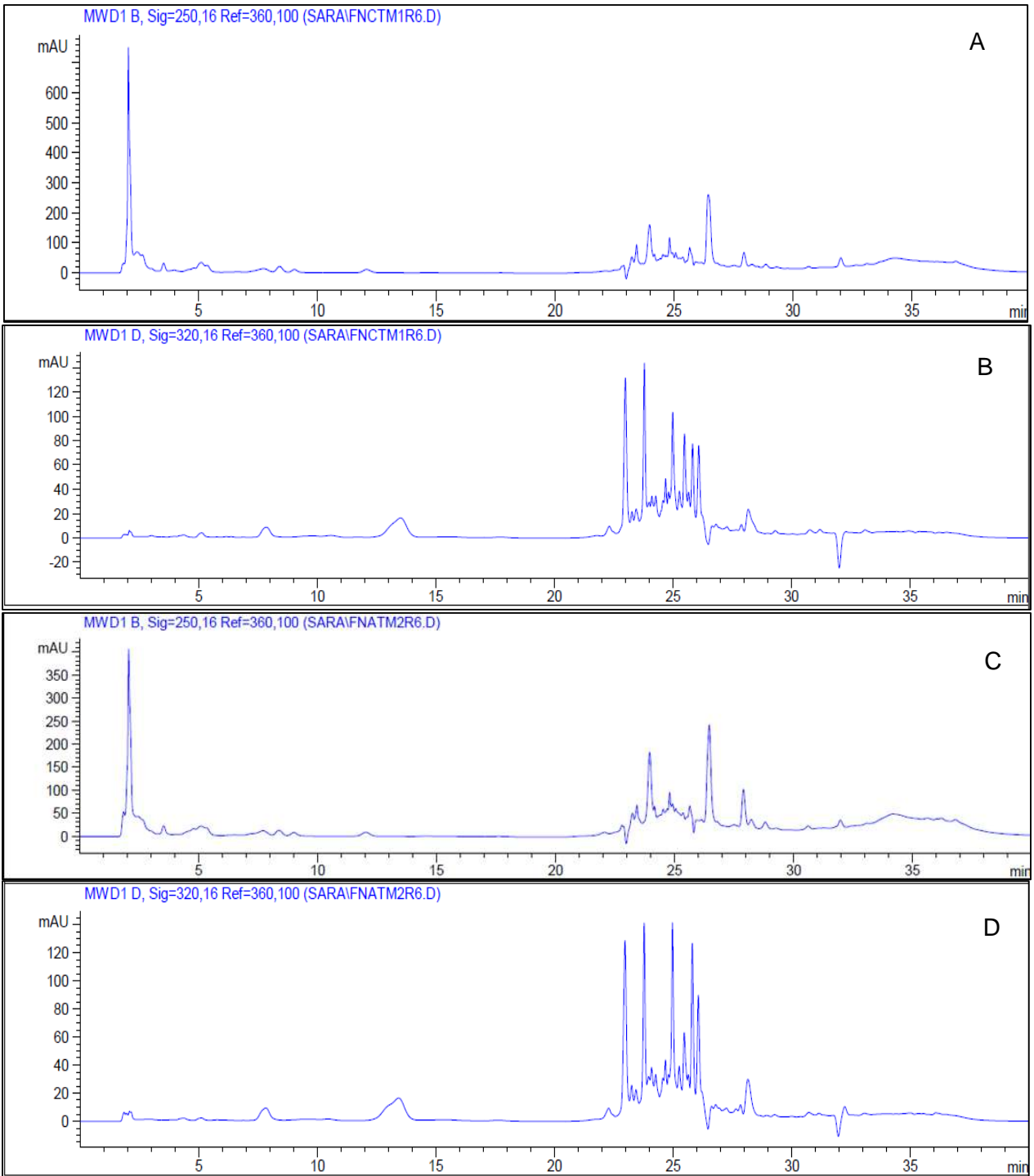


Figura F2. Cromatogramas del tallo en etapa R6 del cultivar Negro Querétaro. A) Tallo sin inóculo a 280 nm. B) Tallo sin inóculo a 320 nm. C) Tallo con inóculo a 250 nm D) Tallo con inóculo a 320 nm.

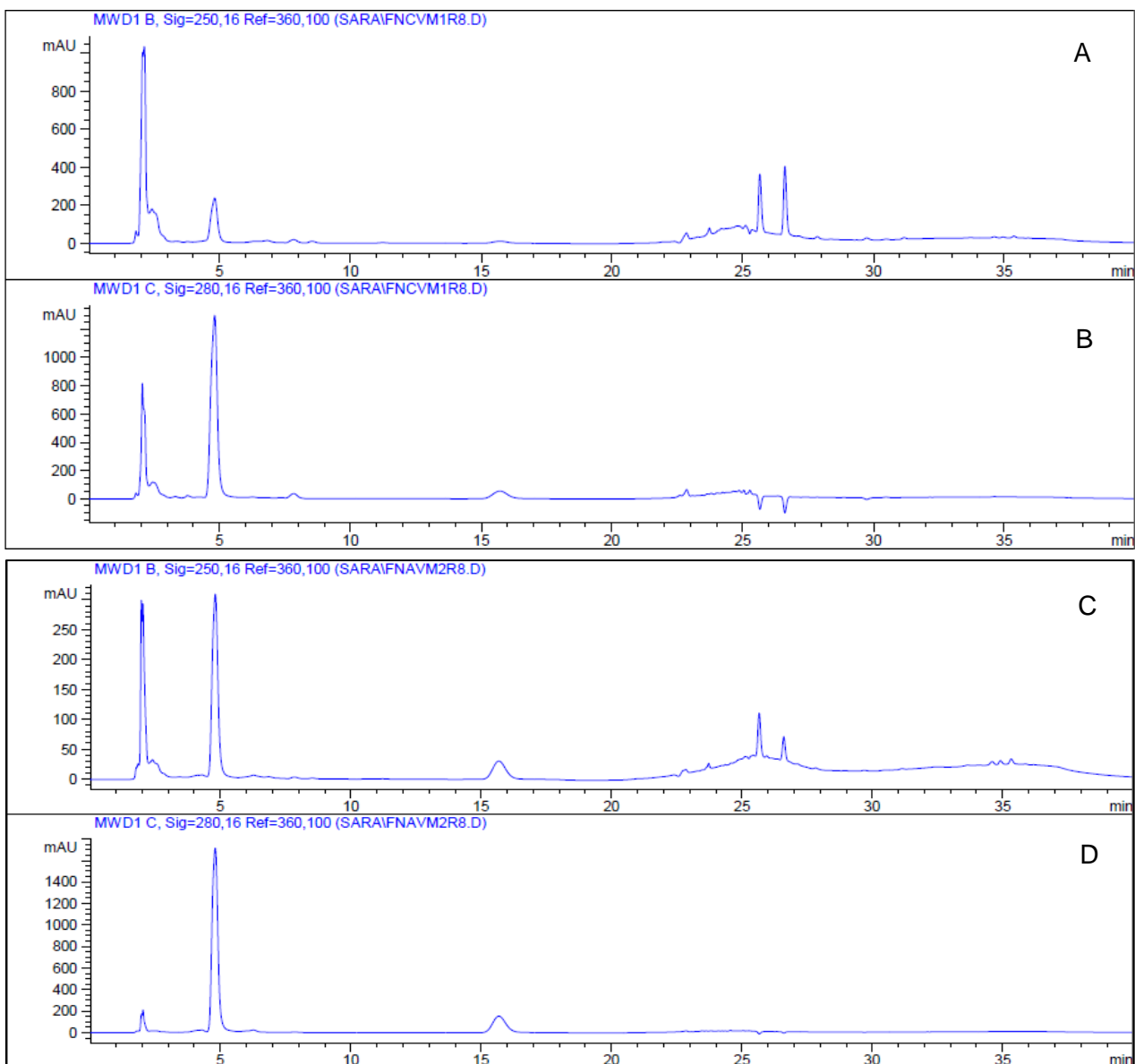


Figura F3. Cromatogramas de las vainas en etapa R8 del cultivar Negro Querétaro. A) Vainas sin inóculo a 250 nm. B) Vainas sin inóculo a 280 nm. C) Vainas con inóculo a 250 nm D) Vainas con inóculo a 280 nm.

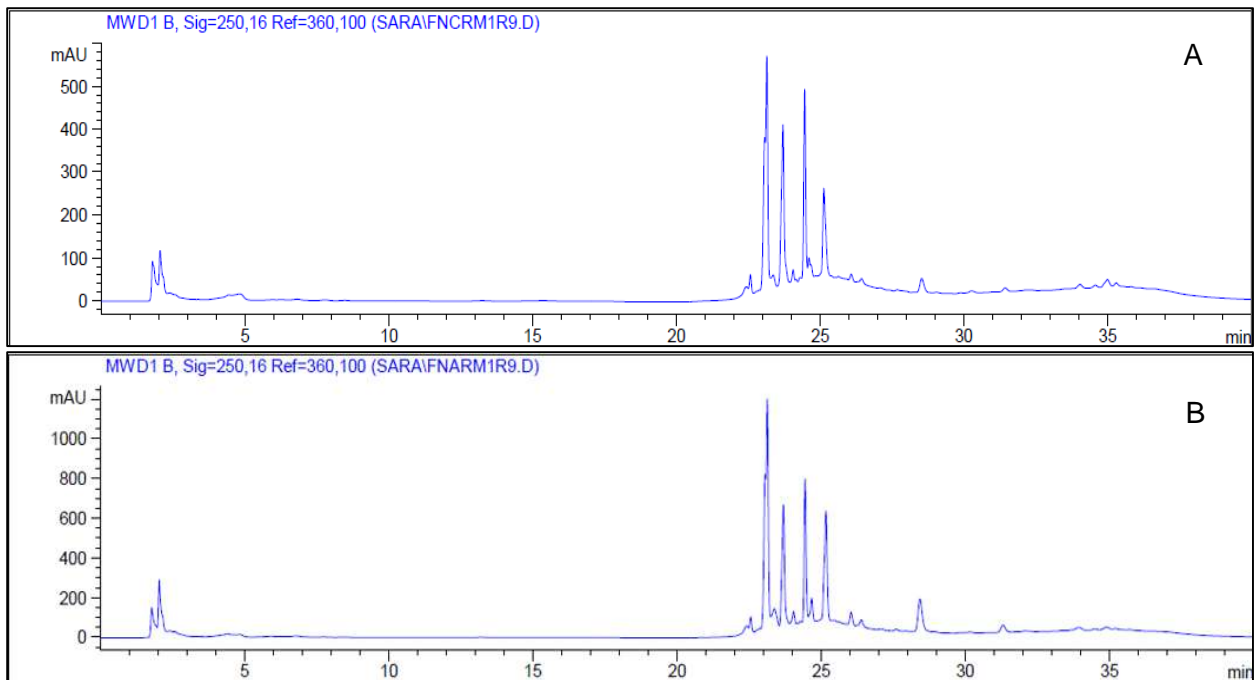


Figura F4. Cromatogramas de la raíz en etapa R9 del cultivar Negro Querétaro. A) Raíz sin inóculo a 250 nm. B) Raíz con inóculo a 250 nm.

## ANEXO G. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN EL CULTIVAR FLOR DE JUNIO

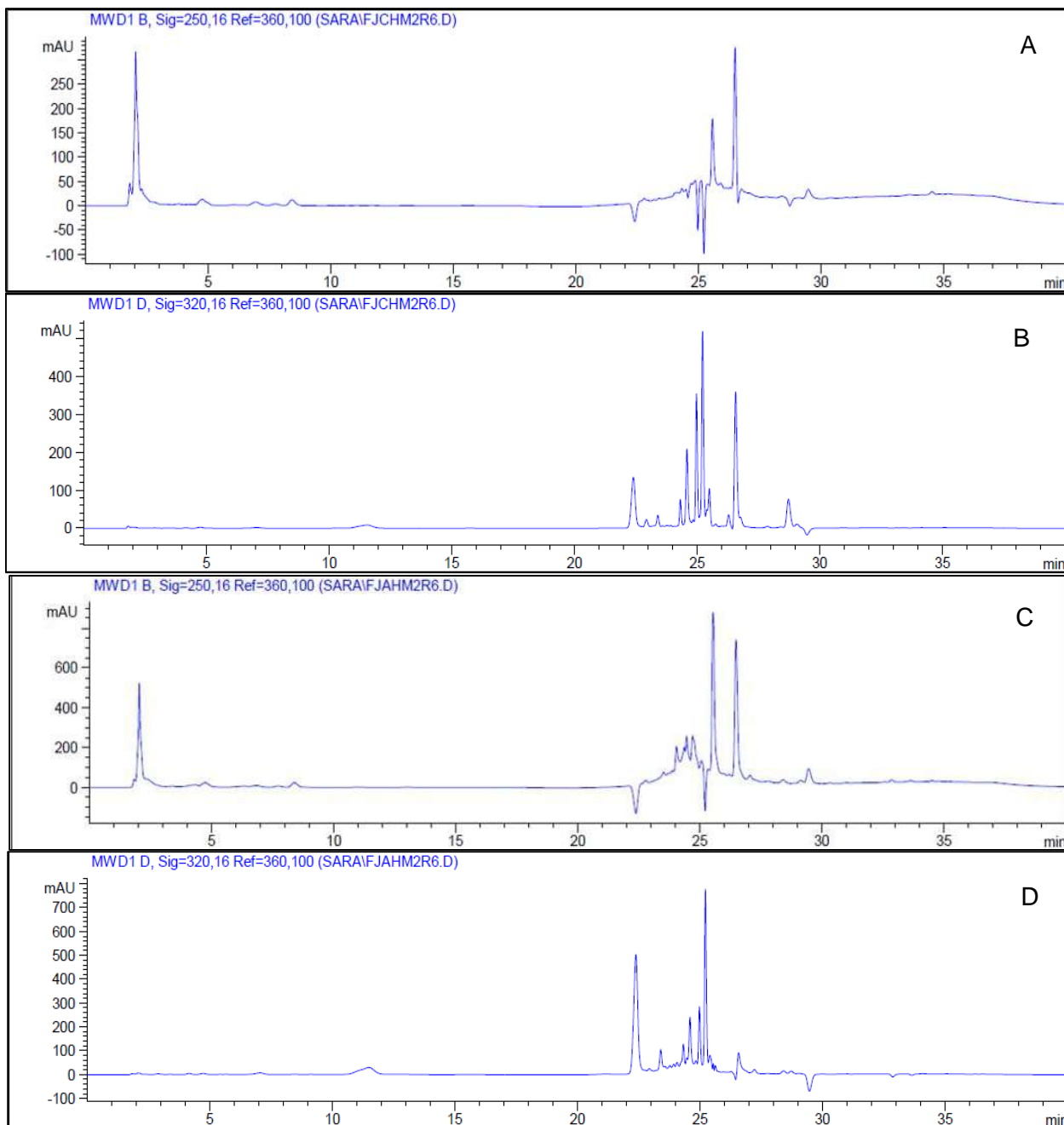


Figura G1. Cromatogramas de las hojas en etapa R6 del cultivar Flor de Junio. A) Hojas sin inóculo a 250 nm. B) Hojas sin inóculo a 320 nm. C) Hojas con inóculo a 250 nm D) Hojas con inóculo a 320 nm.

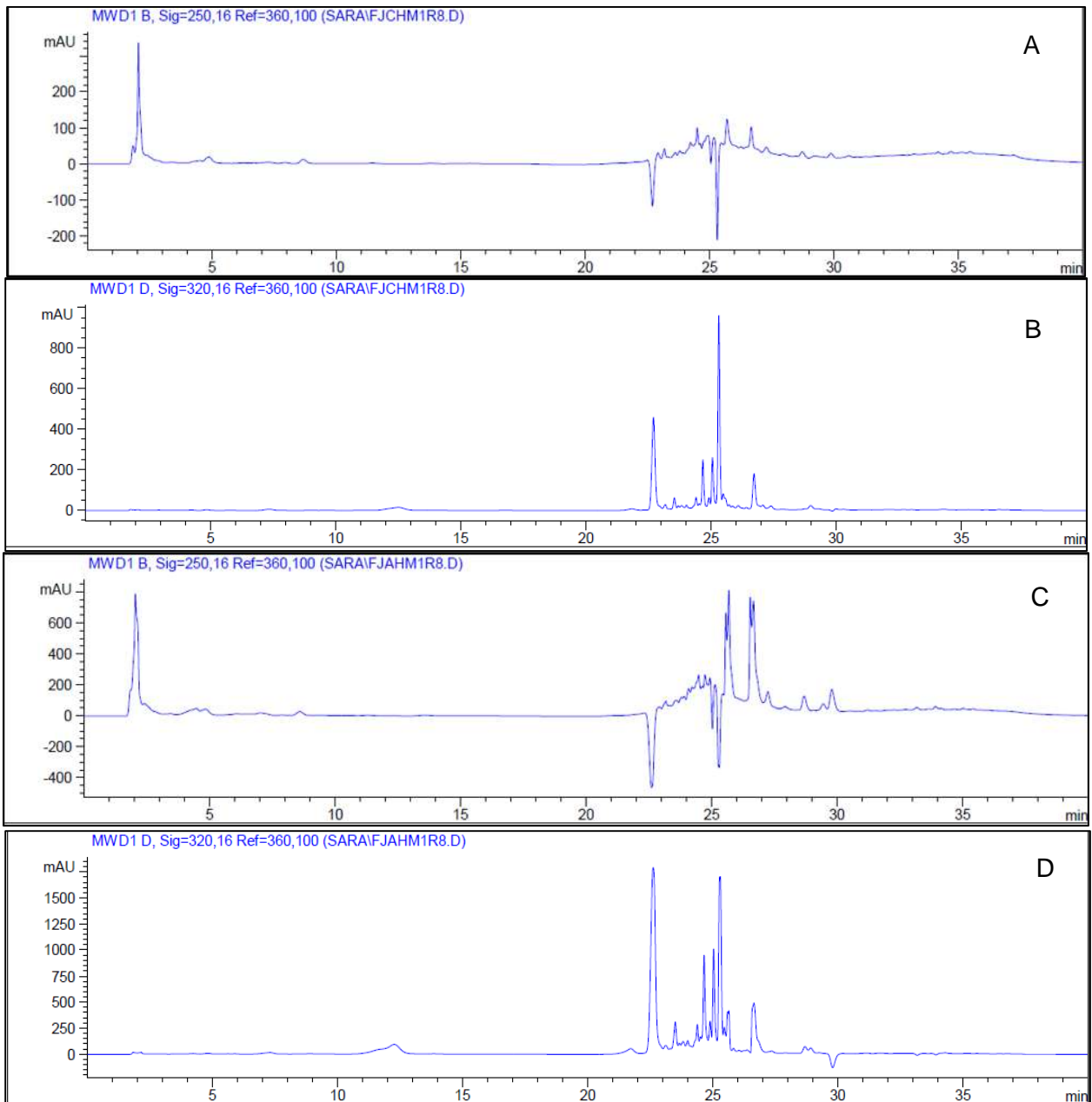


Figura G2. Cromatogramas de las hojas en etapa R8 del cultivar Flor de Junio. A) Hojas sin inóculo a 250 nm. B) Hojas sin inóculo a 320 nm. C) Hojas con inóculo a 250 nm D) Hojas con inóculo a 320 nm.

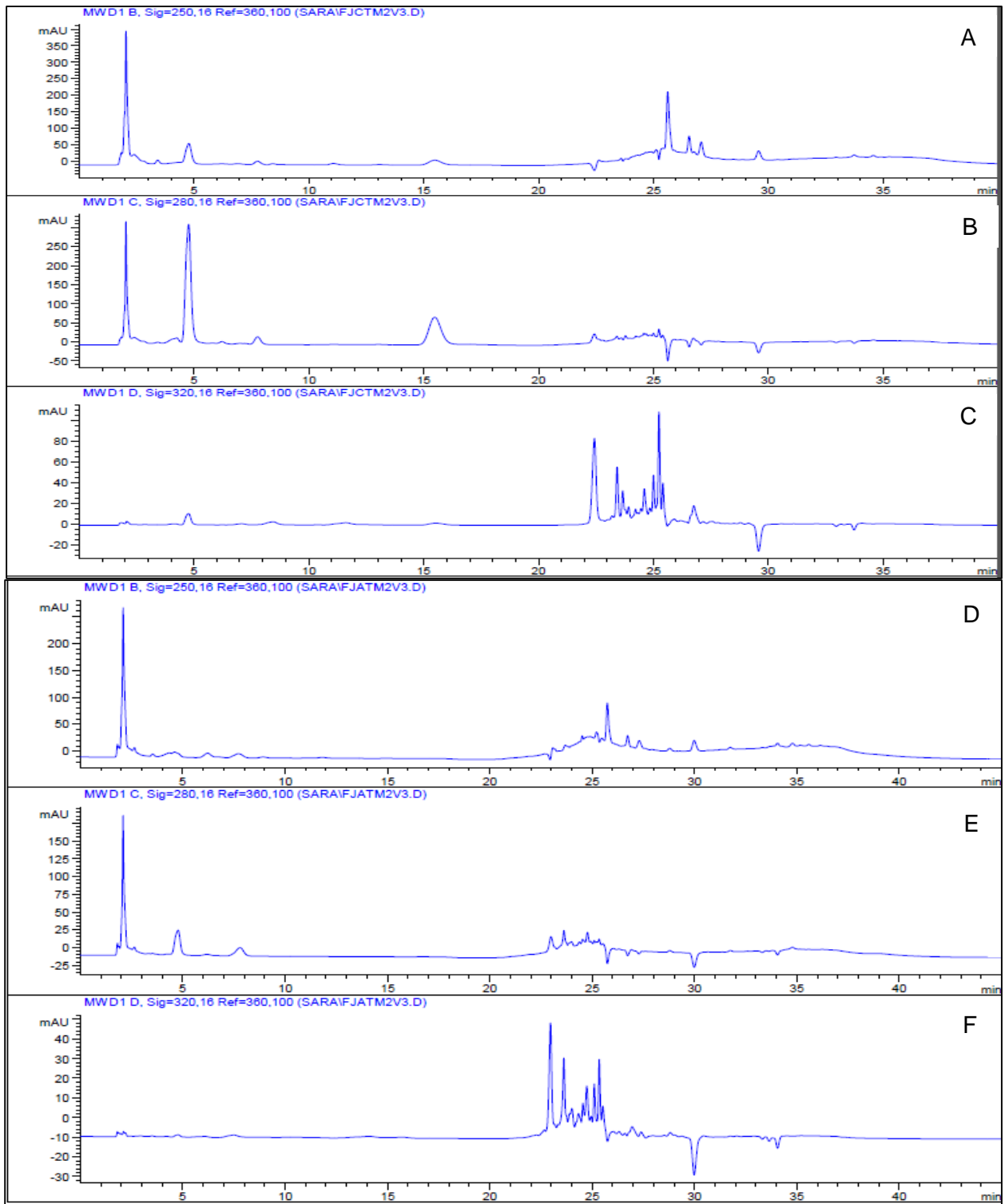


Figura G3. Cromatogramas del tallo en etapa V3 del cultivar Flor de Junio. A) Tallo sin inóculo a 250 nm. B) Tallo sin inóculo a 280 nm. C) Tallo sin inóculo a 320 nm D) Tallo con inóculo a 2500 nm. E) Tallo con inóculo a 280 nm. F) Tallo con inóculo a 320 nm.

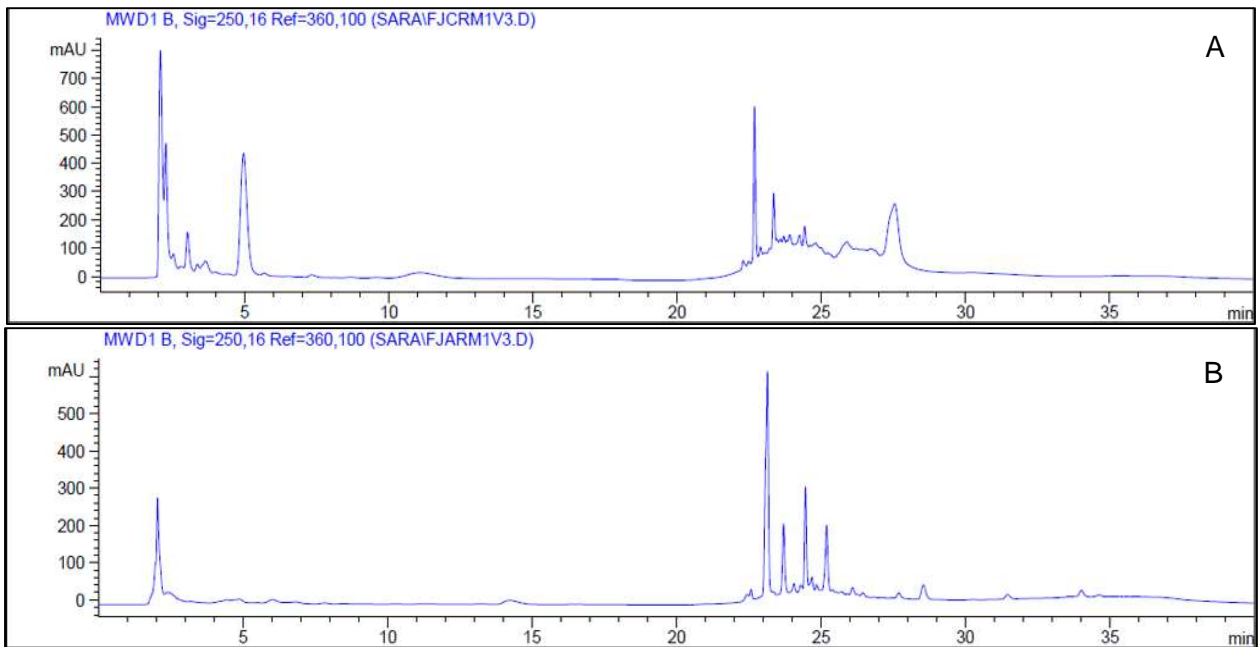


Figura G4. Cromatogramas de la raíz en etapa V3 del cultivar Flor de Junio. A) Raíz sin inóculo a 250 nm. B) Raíz con inóculo a 250 nm.

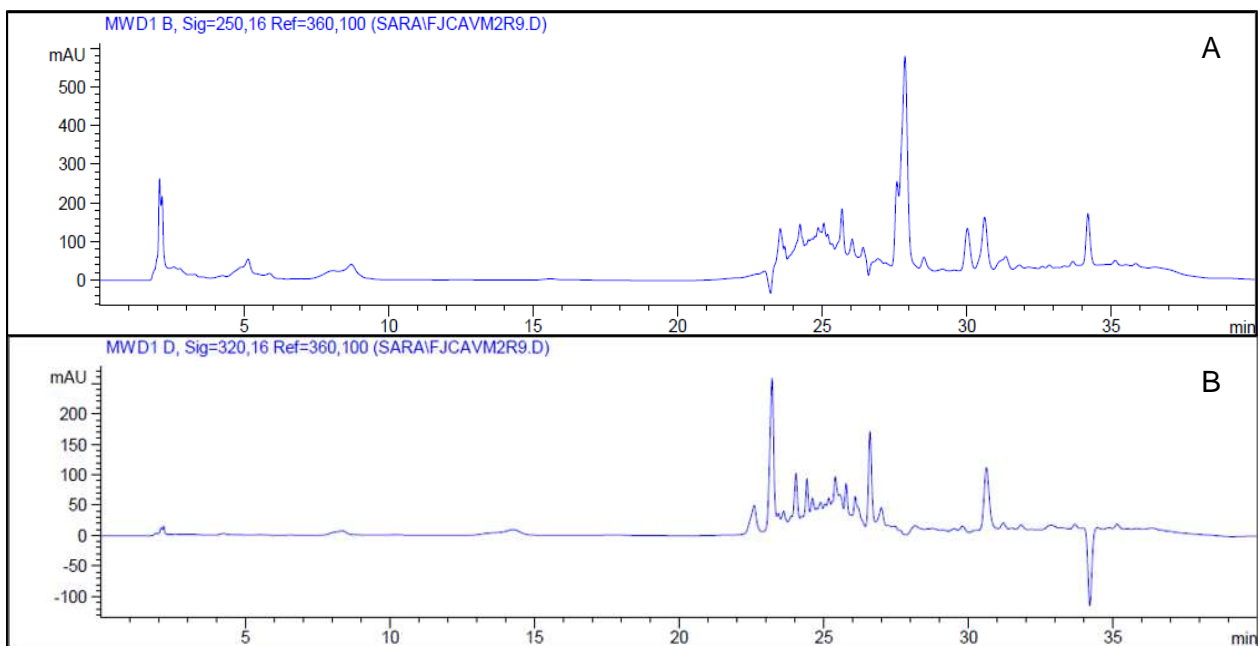


Figura G5. Cromatogramas de las vainas en etapa R9 del cultivar Flor de Junio. A) Vainas con inóculo a 250 nm. B) Vainas con inóculo a 320 nm.

## ANEXO H. CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LA MEZCLA DE ESTÁNDARES

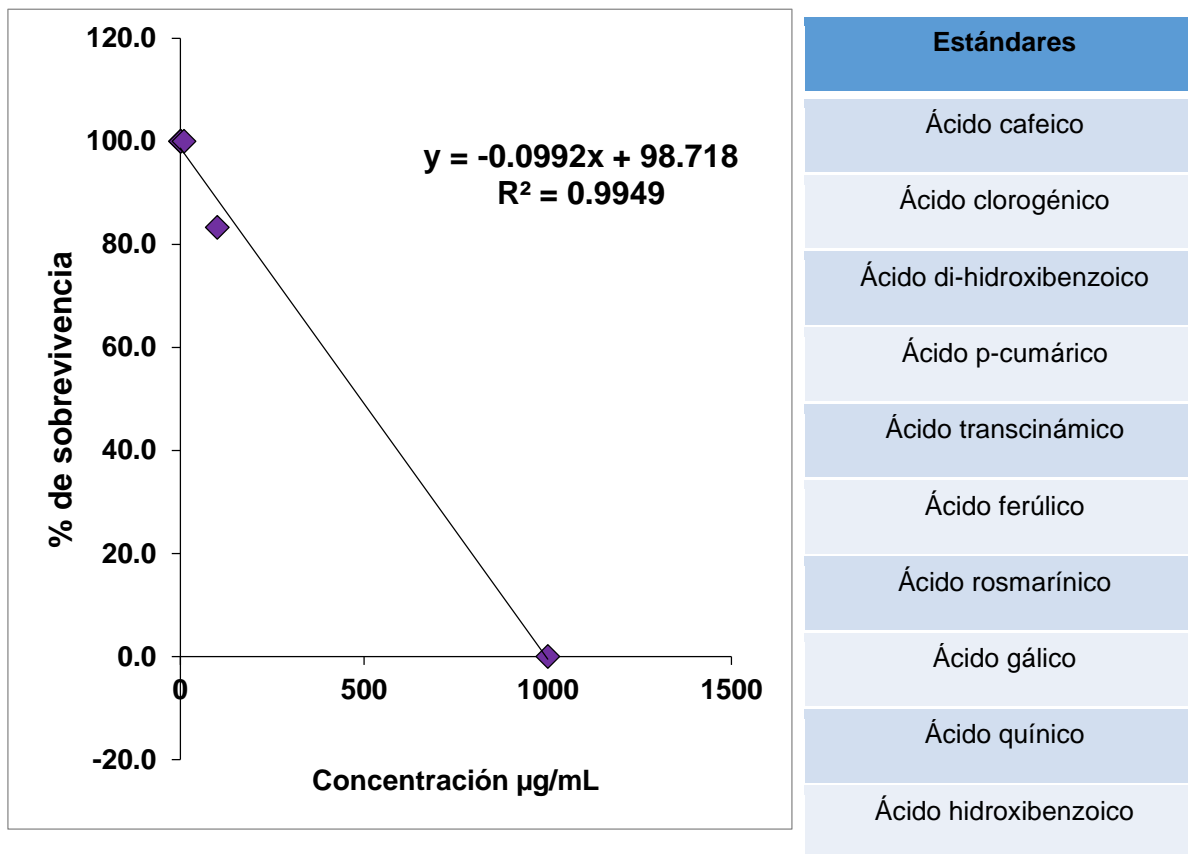


Figura H1. Regresión lineal a los 40 minutos, en el cual se ilustra el procedimiento realizado para el cálculo de  $CL_{50}$  en base al mejor valor de  $R^2$ .