



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS DE FRIJOLES ORIGINARIOS DE MÉXICO**

(Phaseolus coccineus)

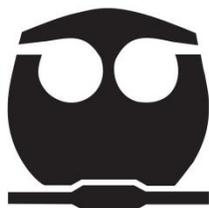
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

CAROLINA BARRIENTOS ESTRADA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2020.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

VOCAL: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SECRETARIO: INÉS MIRANDA MARTÍNEZ

1ER. SUPLENTE: TANIA GÓMEZ SIERRA

2DO. SUPLENTE: SOFÍA MORÁN RAMOS

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología

Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Laboratorio 321, Conjunto E.

ASESOR DEL TEMA:

Arturo Navarro Ocaña

SUPERVISOR TÉCNICO:

María Fernanda Fernández Aulis

SUSTENTANTE:

Carolina Barrientos Estrada

AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento al apoyo económico del PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN TECNOLÓGICA PAPIIT-IN (220015) Y PAPIIT (202318).

CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	11
Compuestos bioactivos	11
COMPUESTOS FENÓLICOS	11
Beneficios a la salud	12
CLASIFICACIÓN GENERAL DE COMPUESTOS FENÓLICOS	13
COMPUESTOS DE TIPO FLAVONOIDE	13
ANTOCIANINAS	13
FLAVONOLES	16
Quercetina	17
COMPUESTOS DE TIPO NO FLAVONOIDE	18
ÁCIDOS FENÓLICOS	18
Ácidos hidroxibenzoicos	19
Ácidos hidroxicinámicos	19
<i>Phaseolus vulgaris</i>	20
Historia de <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
Clasificación taxonómica y botánica de <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Estructura general de <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
Producción de <i>Phaseolus vulgaris</i>	25
Producción nacional.....	25
Consumo nacional.....	26
Producción mundial.....	27
Composición química de <i>Phaseolus vulgaris</i>	27
Propiedades nutricionales de <i>Phaseolus vulgaris</i>	28
Componentes antinutricionales de <i>Phaseolus vulgaris</i>	29
Fitoquímicos presentes en <i>Phaseolus vulgaris</i>	30
Compuestos fenólicos	30
Ácidos fenólicos	30
Flavonoides	31
Antocianinas	31

Perfil de antocianinas en variedades representativas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	33
<i>Phaseolus coccineus</i>	34
Historia de <i>Phaseolus coccineus</i>	34
Clasificación taxonómica y botánica de <i>Phaseolus coccineus</i>	35
Estructura general de <i>Phaseolus coccineus</i>	37
Cultivo de <i>Phaseolus coccineus</i>	38
Composición química de <i>Phaseolus coccineus</i>	39
Propiedades nutricionales de <i>Phaseolus coccineus</i>	39
Componentes anti nutricionales de <i>Phaseolus coccineus</i>	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	41
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS PARTICULARES	41
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	42
Preparación de la muestra	43
Extracción de los compuestos bioactivos fenólicos	43
Ensayos cuantitativos (espectrofotométricos)	44
Fenoles totales (método Folin-Ciocalteu)	44
Flavonoides totales (Método AlCl₃)	45
Antocianinas totales (método pH diferencial)	45
Ensayos cualitativos	46
Cromatografía de Capa Fina (CCF)	46
Cromatografía de capa fina en ácidos fenólicos	47
Cromatografía de capa fina en flavonoides	47
Cromatografía de capa fina en antocianinas	47
Hidrólisis básica para la determinación cualitativa de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos	47
Compuestos fenólicos libres	48
Compuestos fenólicos ligados	48
Extracción de antocianinas con amberlita	48
Cromatografía en columna preparativa	49
Cromatografía de capa fina en placa de vidrio	49
Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas (HPLC-MS)	50

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	50
EQUIPOS Y MATERIALES.....	51
Análisis estadístico	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
Contenido de compuestos bioactivos fenólicos	52
Condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos.....	52
Extracción de compuestos bioactivos fenólicos (sonicación vs Maceración).....	52
Ensayos cuantitativos (espectrofotométricos) en <i>Phaseolus coccineus</i>.....	54
Fenoles totales en <i>Phaseolus</i>	54
Flavonoides totales en <i>Phaseolus</i>	56
Antocianinas totales en <i>Phaseolus</i>	57
Resultados generales en la determinación de compuestos bioactivos fenólicos en <i>Phaseolus</i>	59
Ensayos cualitativos en <i>Phaseolus coccineus</i>	60
Cromatografía en capa fina (CCF) en <i>Phaseolus</i>	60
Antocianinas en <i>Phaseolus</i>	60
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a masas: Antocianinas en <i>Phaseolus coccineus</i>	64
Resultados generales en la determinación de antocianinas por CCF y HPLC en <i>Phaseolus coccineus</i>	65
Identificación de ácidos fenólicos en <i>Phaseolus coccineus</i>	66
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): ácidos fenólicos en <i>Phaseolus coccineus</i>	67
Identificación parcial de compuestos fenólicos presentes en <i>Phaseolus</i> <i>coccineus</i>	67
Compuestos fenólicos.....	67
Identificación de flavonoides en <i>Phaseolus coccineus</i>	69
Cuantificación de antocianina en <i>Phaseolus coccineus</i>	69
Ensayos cuantitativos (espectrofotométricos) en flor de <i>Phaseolus</i> <i>coccineus</i>.....	70
Fenoles totales en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	71
Flavonoides totales en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	72
Antocianinas totales en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	72
Ensayos cualitativos en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>.....	73
Cromatografía en capa fina en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	74

Antocianinas	74
Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas: antocianinas en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>.	76
Resultados generales en la determinación de antocianinas por CCF y HPLC-MS en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>.	77
Identificación de ácidos fenólicos en <i>Phaseolus coccineus</i>	77
Ensayos cualitativos: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): ácidos fenólicos en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	78
Identificación parcial de compuestos fenólicos presentes en flor de <i>Phaseolus coccineus</i>.	78
CONCLUSIONES	80
ANEXO 1	81
Cromatografía en columna preparativa.	81
ANEXO 2	82
Perfil de compuestos fenólicos (Antocianinas en <i>Phaseolus coccineus</i> y su flor).	82
Bibliografía	85

RESUMEN

Phaseolus coccineus (frijol ayocote), es uno de los alimentos tradicionales de México que se produce con abundancia y con características genéticas que lo hacen complemento ideal del maíz; además de ser fuente de proteínas, carbohidratos, fibra y minerales, es rico en compuestos fitoquímicos que proporcionan importantes beneficios para la salud.

Los fitoquímicos son elementos químicos que se encuentran en los alimentos de origen vegetal. Los compuestos bioactivos fenólicos comprenden un enorme grupo de compuestos orgánicos fitoquímicos que contienen por lo menos un grupo fenol, se clasifican en 2 grupos de manera general de acuerdo con su estructura química: flavonoides (formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tri carbonado) y no flavonoides (fenoles no carboxílicos y ácidos fenólicos).

El objetivo general es cuantificar y analizar los compuestos bioactivos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas) presentes en la testa de *Phaseolus coccineus* en variedades de color morado y negro al igual que su flor.

El proyecto se dividió en 4 etapas:

En la primera etapa se trabajó sobre la preparación de la muestra de *Phaseolus coccineus* y su flor, de donde se determinó trabajar sobre la testa de *Phaseolus coccineus*.

Las muestras de *Phaseolus coccineus* se adquirieron de manera local en la Ciudad de México a granel.

Se hizo la separación de la testa mediante la hidratación de *Phaseolus* en relación 1:1 (peso/volumen) durante 24 h, en refrigeración, manteniendo el recipiente tapado para evitar contaminación, posterior a esto se retiró la testa y fue secada en estufa a 45°C durante 4 h, molida y tamizada.

Las muestras de tallos y flores de *Phaseolus coccineus* se obtuvieron del Bosque de Tlalpan, Ciudad de México.

Con las muestras frescas se hizo la separación entre flores y tallos.

Flores y tallos: Liofilización, molienda y tamizado (bajo el mismo proceso que con la testa del *Phaseolus*).

La segunda etapa consistió en optimizar las condiciones de extracción (método: sonicación o maceración y tiempo) las cuales permitieron hacer la cuantificación de compuestos bioactivos totales (fenoles, flavonoides y antocianinas) en testa y flor de *Phaseolus coccineus*.

En la tercera etapa, una vez que se determinaron las condiciones óptimas de extracción, se utilizaron dichos extractos para hacer el análisis cualitativo de la testa y flor de *Phaseolus coccineus* usando técnicas por cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En la cromatografía de capa fina, se usaron extracciones de los compuestos sin purificar y extractos enriquecidos; para cada uno de los compuestos fitoquímicos se utilizaron diferentes fases móviles y como fase estacionaria se utilizó sílica gel, se trabajó en los siguientes compuestos:

- Flavonoides
- Antocianinas
- Ácidos fenólicos

En cromatografía líquida de alta eficacia, se usaron extractos purificados/enriquecidos y se trabajó en los siguientes compuestos:

- Antocianinas
- Ácidos fenólicos

En la cuarta etapa se realizó el análisis cuantitativo de uno de los compuestos presente en testa de *Phaseolus coccineus* y su flor utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

INTRODUCCIÓN

Phaseolus coccineus (frijol ayocote), es una leguminosa nativa de México con gran potencial de uso y aprovechamiento con fines alimenticios para la población humana mediante el uso de su follaje, flores, vainas y semillas (Basurto, et al., 1996).

El cultivo del frijol en nuestro país tiene profundas raíces milenarias. Actualmente, el papel de esta leguminosa sigue siendo fundamental en lo económico, porque representa para la economía campesina una fuente importante de ocupación e ingreso, así como una garantía de seguridad alimentaria, vía autoconsumo; mientras que en la dieta representa, la principal y única fuente de proteínas para amplias capas de la población mexicana (Perera, 1997).

Existen numerosos estudios clínicos que avalan que el consumo regular de frijol ayuda a la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus, obesidad y enfermedades relacionadas con el aparato digestivo, ya que reduce el nivel de colesterol y glucosa en la sangre (Saburido Álvarez & Herrera Estrella, 2015).

Los colores en las variedades de frijol negro, morado, rojos, entre otros, son causados por su contenido de antocianinas, estos polifenoles se encuentran presentes en cantidades elevadas en la cáscara principalmente y se ha demostrado que presentan un beneficio en la salud, ya que actúan como antioxidantes.

MARCO TEÓRICO

Compuestos bioactivos

El Departamento Federal de Salud en Canadá indica que los compuestos o sustancias bioactivas son "alimentos con una apariencia similar a un alimento convencional, consumidos como parte de una dieta normal, que poseen beneficios fisiológicos probados y/o que reducen el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas". Asimismo, la acción concertada de la Comisión Europea sobre la Ciencia de la Alimentación funcional en Europa (FUFOSE) clasifica un alimento como funcional "si se demuestra satisfactoriamente" afectar beneficiosamente una o más funciones objetivo en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, en una manera que sea relevante para mejorar el estado de salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad. Finalmente, en los Estados Unidos se definen como "alimentos o sus componentes que brindan beneficio para la salud más allá de la nutrición básica" (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017).

COMPUESTOS FENÓLICOS

Para comprender la estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar con el fenol, que es la molécula básica (Figura 1). El fenol se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Peñarrieta, et al., 2014).

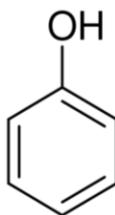


Figura 1. Estructura química del fenol.

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el

reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados *de novo* por las plantas y son regulados genéticamente. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta.

Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor (Creus, 2004).

Beneficios a la salud

Son compuestos bioactivos ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes, por lo tanto, tienen un papel muy importante para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer, Alzheimer y enfermedades de Parkinson.

En la prevención de enfermedades cardiovasculares de todos los compuestos fenólicos, el grupo de los flavonoides es el más extendido en la naturaleza y dentro de ellos, los flavonoles son los que poseen una mayor actividad antioxidante. Estudios epidemiológicos han demostrado que una ingestión rica en flavonoides se correlaciona con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y se ha observado que actúan a diferentes niveles (Creus, 2004).

Las propiedades antioxidantes de estos compuestos radican en su capacidad para neutralizar los radicales libres y la quelación de los metales de transición, por lo tanto, contrarrestan la iniciación y propagación de los procesos oxidativos. (Huber, et al., 2016).

Para clasificar los compuestos fenólicos es importante determinar en función de que se hace dicha clasificación dependiendo los compuestos de interés,

para la realización de este proyecto se elaboró sobre una clasificación general dada su estructura química.

CLASIFICACIÓN GENERAL DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

- ❖ Compuestos de tipo flavonoide.
- ❖ Compuestos de tipo no flavonoide.

Dentro de cada uno de estos compuestos hay diferentes subgrupos de compuestos, algunos de los cuales fueron estudiados en el presente proyecto y se menciona estos a continuación.

COMPUESTOS DE TIPO FLAVONOIDE

Dentro de los compuestos de tipo flavonoide se encuentran distintos subgrupos:

- Antocianinas.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos.

Como parte de los objetivos se planteó identificar y cuantificar compuestos de tipo flavonoide, siendo antocianinas uno de los principales.

ANTOCIANINAS

Las antocianinas son utilizadas en la industria de alimentos como colorantes naturales, y se enumeran en el *Codex Alimentarius* bajo el código E169 (Peñarrieta, et al., 2014).

Representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles en la región visible por el ojo humano; estos pigmentos son normalmente disueltos uniformemente en la solución vacuolar de las células epidérmicas, poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para

la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta, contaminación viral y microbiana. (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015).

La estructura básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilio, también llamado sal de flavilo (Figura 2).

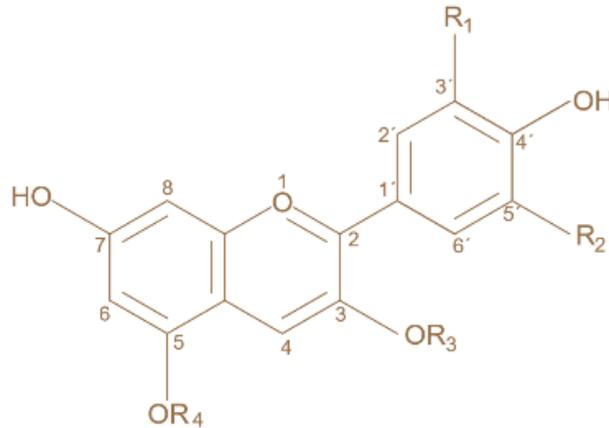


Figura 2. Cation flavilio.

R₁ y R₂= -H, OH, -OCH₃, **R₃**=-glicósilo, **R₄**=-H O-glicósilo.

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. (Stintzing, et al., 2002), demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura, adicional le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura. Cuando en la molécula de antocianina se encuentran

únicamente azúcares, se denominan no asiladas; si además de los azúcares están presentes uno o varios radicales acilos, se catalogan como asiladas.

Existen 19 antocianidinas naturales conocidas, pero solo seis ocurren frecuentemente en los alimentos (Figura 3).

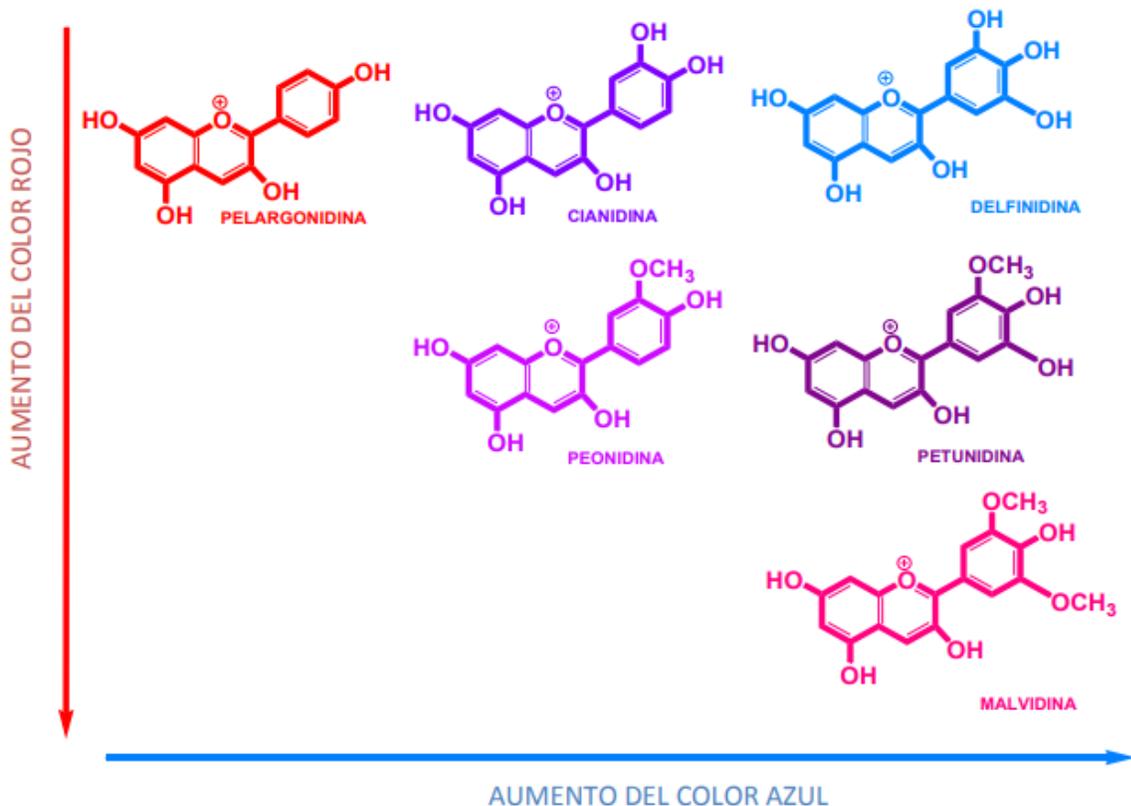


Figura 3. Las antocianinas más comunes en función del sustituyente en la coloración de las antocianinas.

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran (Yoshida, et al., 1996).

Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura, concentración de las antocianinas, y la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales (Hou, et al., 2004).

Las antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales rojos. Como es el caso de los pigmentos rojos en rábanos, cebollas rojas, cerezas, frambuesas, arándanos, fresa, chile de árbol, camote, maíz, frijol, entre otros.

El interés en los pigmentos como las antocianinas se ha intensificado debido no solamente por el color que confieren sino a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas; dentro de los efectos terapéuticos conocidos se incluyen la reducción de enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, además de un mejoramiento en la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos están relacionados con su actividad antioxidante (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015).

FLAVONOLES

Son pigmentos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como agentes protectores contra la luz UV o contra infecciones por organismos fitopatógenos.

Como los flavonoides son compuestos fenólicos, están químicamente definidos como una sustancia que posee un anillo aromático conteniendo un grupo hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Rocha, 2012).

Los flavonoles se caracterizan por tener un grupo hidroxilo en el carbono 3 del esqueleto flavonoide, un doble enlace entre el carbono 2 y 3; así como un oxígeno unido al carbono 4.

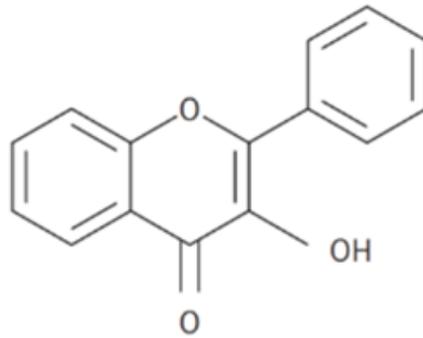


Figura 4. Estructura general de los flavonoles.

Los tipos de flavonoles y su diversidad se basan en las diferentes posiciones de grupos OH-fenólicos, uno de los más importantes y conocidos es:

Quercetina

Químicamente, la quercetina es tricíclico poli hidroxilado, que en la naturaleza se encuentra glicosilado formando parte de la rutina (quercetin-3-rutinósido), de la isoquercitrina (quercetin-3-O-glucósido) o de otros glicósidos siendo la aglicona de todos ellos.

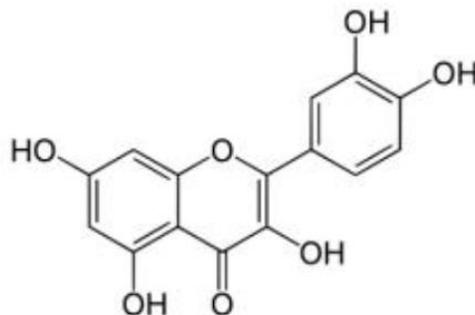


Figura 5. Estructura química de quercetina.

Es un pigmento natural hidrosoluble encontrado principalmente en cebolla amarilla, cebollín, col rizada, brócoli, manzanas, berries, té.

Estos compuestos tienen propiedades muy importantes para prevenir enfermedades y promover una buena salud; tienen la capacidad de ser

potentes antioxidantes y quelantes de metales. Al ser antioxidantes, son muy efectivos en reducir el riesgo de presentar cáncer.

Los efectos protectores de los flavonoles en sistemas biológicos se deben a su capacidad de transferir electrones libres radicales, catalizar la quelación de metales, activar enzimas antioxidantes, reducir radicales alfa tocoferol e inhibir oxidasas (Rocha, 2012).

COMPUESTOS DE TIPO NO FLAVONOIDE

Entre ellos hay dos subgrupos:

- Fenoles no carboxílicos: C₆, C₆-C₁, C₆-C₃.
- Ácidos fenólicos: Derivados del ácido benzoico C₆-C₁ y derivados del ácido cinámico C₆-C₃.

Como parte de los objetivos, se determinó identificar y cuantificar como compuestos de tipo no flavonoide a los ácidos fenólicos, y por ello se amplió la información seguidamente sobre tales compuestos.

ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos son una subclase de la categoría fenólica más grande, que se encuentra en plantas alimenticias como ésteres o glucósidos conjugados con otros compuestos naturales como flavonoides, alcoholes, ácidos grasos hidroxilo, esteroides y glucósidos. Aunque todavía se necesita mucho conocimiento sobre el papel de los ácidos fenólicos en las plantas, se han asociado con diversas funciones, que incluyen la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática, la fotosíntesis, los componentes estructurales y la alelopatía (Goleniowski, et al., 2013).

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos.

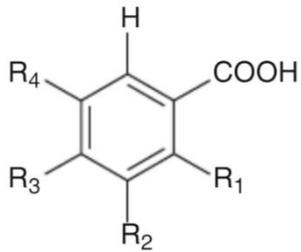
Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático (Tabla 1).

Están presentes en alimentos tales como frutas (granada, uvas negra y verde), verduras y cereales.

Muchos estudios han informado de la actividad biológica de los ácidos hidroxibenzoicos, por ejemplo, el ácido protocatecuico presentó un efecto protector frente a lesiones de hígado en modelos animales (Peñarrieta, et al., 2014).

Tabla 1. Ácidos hidroxibenzoicos.

	Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Ácido benzoico	H	H	H	H
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H	H
Ácido vinílico	H	OCH ₃	OH	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH	OH
Ácido protocatecuico	H	OH	OH	H	H
Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
Ácido gentílico	OH	H	H	H	OH
Ácido verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H	H

Ácidos hidroxicinámicos

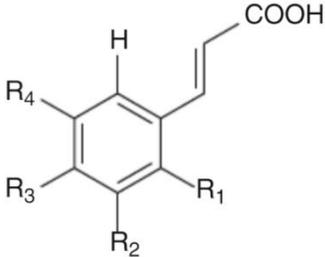
Esta clase de ácidos fenólicos se caracteriza por la presencia del grupo ácido carboxílico α-β insaturado (**CH=CH-COOH**) en remplazo del grupo ácido carboxílico (**COOH**) presente en los ácidos hidroxibenzoicos.

Ejemplos de fuentes de ácidos hidroxicinámicos en los alimentos son las uvas, manzanas, arándanos, espinacas, brócoli, col rizada, el café y los cereales.

Una de las principales propiedades biológicas de estos compuestos es su alta actividad antioxidante, que se debe a su estructura química, que contiene un núcleo fenólico y una cadena lateral insaturada que les permite formar un radical fenoxilo estabilizado por resonancia, el cual tiene actividad como agente secuestrador de radicales libres (Urías-Orona, et al., 2016).

Aparte de su capacidad antioxidante, los ácidos hidroxicinámicos han mostrado actividad anti genotóxicos y anti proliferativa en células (Peñarrieta, et al., 2014).

Tabla 2. Ácidos hidroxicinámicos.

	Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Ácido cinámico	H	H	H	H
Ácido o-cumárico	OH	H	H	H	
Ácido m- cumárico	H	OH	H	H	
Ácido p- cumárico	H	H	OH	H	
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H	
Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	
Ácido cafeico	H	OH	OH	H	

Como parte del proyecto caracterización y análisis de compuestos biológicamente activos de frijoles originarios de México *Phaseolus coccineus*, se usa como referencia *Phaseolus vulgaris* debido a que existe más información general, así como en su perfil de compuestos fenólicos.

Phaseolus vulgaris

En el país se conoce como frijol a diferentes especies del género *Phaseolus*, entre las cuales, las de mayor importancia económica son:

- *Phaseolus vulgaris* (frijol común).
- *Phaseolus coccineus* (frijol ayocote).
- *Phaseolus lunatus* (frijol lima).
- *Phaseolus acutifolius* (frijol tépari).

(Saburido Álvarez & Herrera Estrella, 2015)

Phaseolus vulgaris es uno de los alimentos emblemáticos y más estudiados de México, felizmente adaptado a las distintas geografías nacionales, se produce con abundancia y se sabe que posee características genéticas que lo hacen el complemento ideal del maíz, tanto desde su desarrollo como cuando se le consume (Vela, 2010).

Historia de *Phaseolus vulgaris*

Los estudios arqueológicos revelan que el frijol, del género *Phaseolus*, se originó en el continente americano. Al respecto se han encontrado evidencias con antigüedad de 500 a 8 mil años en algunas regiones de México, Estados Unidos y Perú (Reyes Rivas, et al., 2008).

Kaplan estableció que *Phaseolus vulgaris* se domesticó en el Valle de Tehuacán, Puebla, México hace aproximadamente 7000 años, probablemente en asociación con el maíz. El análisis de los restos de plantas con base en la prueba del carbono 14 indicó que la edad media del *Phaseolus vulgaris* domesticado es de 7680 ± 280 años (Kaplan, et al., 1973).

Bernardino de Sahagún, en su obra Historia general de las cosas de la Nueva España, da cuenta de las diversas formas en las que se consume y almacena *Phaseolus vulgaris*, al igual que otros productos cultivados por los indígenas de la Nueva España, hecho supuestamente anterior a la Conquista española (1519–1521), por tanto, esta leguminosa ya formaba parte vital de la cultura alimenticia de los nativos.

Hay quien estima que la rápida difusión *Phaseolus vulgaris* en Europa tiene como elementos principales su gran capacidad de adaptarse a diversos climas (húmedos y fríos) y la aceptación, como fuente alimenticia, que tiene incluso entre la nobleza.

Actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta, especialmente en Centroamérica y Sudamérica (Reyes Rivas, et al., 2008).

Clasificación taxonómica y botánica de *Phaseolus vulgaris*

Existen en el mundo aproximadamente 150 especies del género *Phaseolus*, al que pertenece la planta del frijol; de ellas 67 proceden de México y de éstas se cultivan cinco, las más usuales: *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris* (Vela, 2010).

Taxonómicamente, el frijol corresponde a la especie del género *Phaseolu*; su nombre completo es *Phaseolus vulgaris Lam*, asignada por Linneo en 1753, el género *Phaseolus* se clasifica dentro de la familia *Leguminoseae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Phaseolae* y subtribu *Phaseolinae* al orden *Rosales* (Ulloa, et al., 2011).

Es una planta herbácea autógama de ciclo anual, que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. Esta característica permite agruparla en las denominadas especies termófilas, dado que no soporta bajas temperaturas. El ciclo vegetativo de *Phaseolus vulgaris* puede variar entre 80 (variedades precoces) y 180 días (variedades trepadoras). Dicho lapso se encuentra determinado sobre todo por el genotipo de la variedad, hábito de crecimiento, clima, suelo, radiación solar y fotoperiodo (Reyes Rivas, et al., 2008).

Estructura general de *Phaseolus vulgaris*

Hay tres partes principales en las semillas de leguminosas, el cotiledón, la capa de la semilla, y el hacha embrionaria.

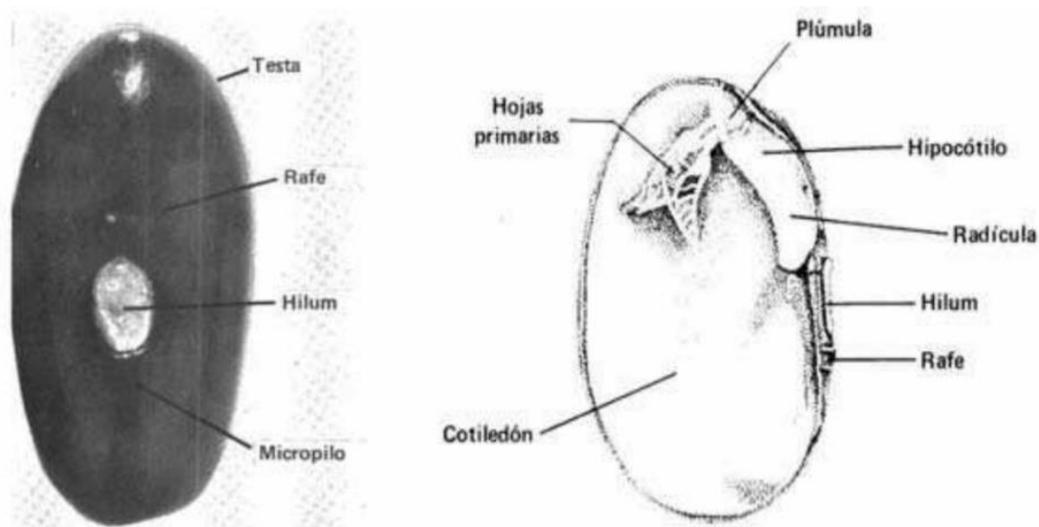


Figura 6. Partes externas e internas más importantes de la semilla de *Phaseolus*.

En la figura 6 se muestran las partes más importantes de la semilla de *Phaseolus vulgaris*:

- Testa o cubierta, que corresponde a la capa secundina del óvulo.
- El hilum, o cicatriz dejada por el funículo, el cual conecta la semilla con la placenta.
- El micrópilo que es una abertura en la cubierta o corteza de la semilla cerca del hilum. A través de esta abertura se realiza principalmente la absorción del agua.
- El rafe, proveniente de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo campilótropo.

El complejo plúmula-radícula está situado entre los cotiledones, al lado ventral del grano de tal manera que la radícula está en contacto con el micrópilo. En el grano seco el complejo plúmula-radícula, ocupa solamente una parte muy reducida del espacio libre entre los cotiledones. Calculado en base a materia seca de la semilla, la testa representa el 9%, los cotiledones 90% y el embrión el 1% (Debouck, 1984).

Cultivo de *Phaseolus vulgaris*.

Pese a los grandes esfuerzos de investigación que se han realizado, *Phaseolus vulgaris* sigue siendo un cultivo vulnerable a las sequías, las heladas tempranas, al ataque de plagas y enfermedades, o bien, al exceso de lluvia fuera de tiempo (Perera, 1997).

La siembra se realiza a mano o con sembradora, enterrando la semilla a una profundidad de 3 a 5cm, con una distancia entre plantas de 6cm y entre hileras de 60 a 80cm. Antes de sembrar se debe verificar que el suelo tenga suficiente humedad para garantizar una germinación uniforme.

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo de *Phaseolus vulgaris* oscilan entre 10 y 27°C, pues es muy susceptible a condiciones extremas y debe sembrarse en suelos de textura ligera y bien drenada.

El pH adecuado fluctúa entre 6.5 y 7.5, ya que dentro de estos límites la mayoría de los elementos nutritivos del suelo presenta su máxima disponibilidad; no obstante, se comporta bien en terrenos que tienen un pH de 4.5 a 5.5 (SIAP, 2016).

La cosecha se realiza en tres fases: arranque, enchorizado y trilla, e inicia al presentarse la madurez fisiológica de la planta. El corte se puede realizar en forma manual o mecánica; los chorizos se forman entre 8 y 12 días después, cuando el follaje esté completamente seco con 8 o 12 surcos, dependiendo de lo voluminoso del follaje. Existen equipos que en un solo paso realizan el corte y enchorizado. Para la trilla se debe considerar el porcentaje de humedad del grano, el cual debe variar del 12 al 14% para evitar el daño en el grano (Inforural, 2012).

Producción de *Phaseolus vulgaris*.

Producción nacional

Phaseolus vulgaris es el cuarto cultivo en importancia por la superficie sembrada en México, después del maíz grano, pastos y el sorgo grano; por el valor de la producción primaria que genera, ocupa la undécima posición, considerando cultivos cíclicos y perennes (FIRA, 2016).

Zacatecas es la principal entidad productora de *Phaseolus vulgaris*, con una participación del 25%, seguida de Sinaloa con el 16%, Durango con el 13%, Chihuahua con el 11% y Nayarit con el 7%. Estas entidades ubicadas en el norte-occidente del país generan un volumen de producción de 760 mil toneladas de frijol lo que representa el 73.9% del total nacional. Chiapas es la única entidad del sursureste con una importante participación en la producción de 7% (Rural, 2011).

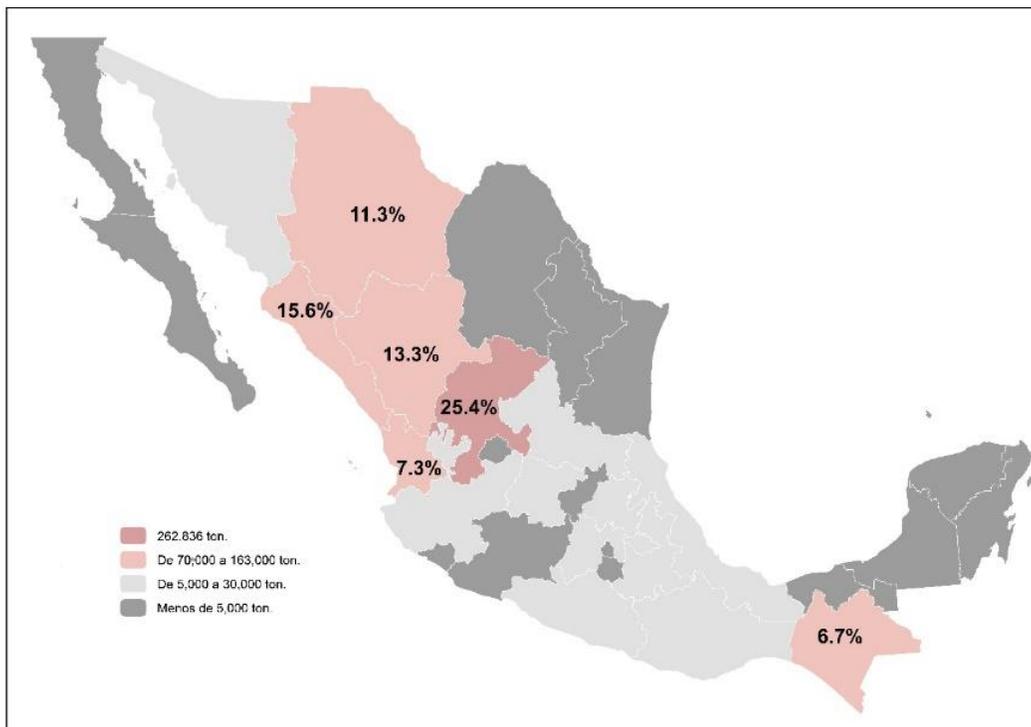


Figura 7 Producción nacional de *Phaseolus vulgaris*.

En nuestro país se cultivan principalmente las variedades claras y negras de *Phaseolus vulgaris*, las primeras ocupan el 67% de la producción y las segundas el 30%. El restante 2% se refiere a otras variedades o bien producción no clasificada (Rural, 2011).

Consumo nacional

Phaseolus vulgaris es la leguminosa más consumida en México, lo que no es extraño si se considera su gran disponibilidad, su bajo precio, la existencia de numerosas variedades, su atractivo sensorial y su gran valor cultural al estar profundamente arraigado desde hace miles de años (Delgado Salinas, et al., 2012).

El consumo de *Phaseolus vulgaris* en México durante los últimos tres años se ubicó en un promedio de 1.1 millones de toneladas.

Las preferencias en el tipo de *Phaseolus* consumido varían de una región a otra del país; mientras que en la región norte del país existe preferencia por los frijoles pintos, en la zona noroeste se prefiere el frijol azufrado, en la región centro las variedades flor de mayo y flor de junio, y en el sur y sureste se tiene preferencia por el frijol negro (FIRA, 2016).

El consumo per cápita de *Phaseolus* en México muestra una tendencia a la baja durante los últimos treinta años, al pasar de un promedio de 16 kilogramos por persona por año en la década de 1980 a 9.9 (27.2g/día) kilogramos en la actualidad.

Asimismo, también se ha venido presentando la sustitución del consumo de *Phaseolus vulgaris* en grano por *Phaseolus vulgaris* industrializado, debido a la facilidad que representa su uso con respecto a *Phaseolus vulgaris* en grano (FIRA, 2016) (SIAP, 2016).

Producción mundial

El primer productor mundial con 4,651,094 toneladas es Myanmar, el volumen de la nación líder productora representa 17.5% del total mundial, aunque la India, entre los países que cultiva *Phaseolus*, es quien más superficie le destina (10 millones de hectáreas).

México se ubica como el quinto productor mundial con 1, 273,957 toneladas, de los sembradíos mexicanos se obtiene 4.8% de la leguminosa cosechada en el mundo, México exporta *Phaseolus* a 27 países, pero Estados Unidos es el principal destino ya que adquiere cinco de cada 10 toneladas. El volumen que nuestro país importa proviene de esa misma nación (SIAP, 2016).

Composición química de *Phaseolus vulgaris*

La composición química de las semillas está determinada genéticamente, pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales o el clima (Vela, 2010). La composición de las semillas aparece en la tabla 3; como regla general, cabe esperar que ya cocidos tengan la tercera parte de las concentraciones señaladas.

Tabla 3. Composición química del *Phaseolus* (por 100 gramos en base húmeda) *

Variedad	Proteínas	Energía	Grasa	Hidratos de carbono	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Calcio	Hierro
	g	kcal	g	g	mg	mg	mg	mg	mg
Amarillo	14.2	337	1.7	67.1	0.62	0.12	2.1	347	4.8
Azufrado	20.9	337	1.5	61.9	0.52	0.14	1.3	254	5.3
Bayo gordo	22.7	332	1.8	58.5	0.69	0.14	1.7	200	5.7
Blanco	22.5	312	2.7	52.0	0.60	0.15	1.8	185	4.6
Garbancillo	18.0	340	1.7	66.4	0.54	0.14	1.7	300	4.9
Negro	21.8	322	2.5	55.4	0.63	0.17	1.8	183	4.7
Ojo de liebre	17.5	328	1.5	62.0	0.72	0.13	1.5	307	5.2
Palacio	22.2	344	1.5	62.4	0.85	0.13	1.6	759	6.9
Rosita	19.2	373	6.2	61.0	0.74	0.17	1.5	105	8.9

*Variedades cultivadas en México. Contenido de humedad 10-12% (Adaptada de H. Bourges Rodríguez, 2008).

Propiedades nutricionales de *Phaseolus vulgaris*

Las propiedades nutritivas que posee *Phaseolus vulgaris* están relacionadas con su alto contenido proteico y en menor medida a su aportación de carbohidratos, vitaminas y minerales.

Dependiendo del tipo de *Phaseolus vulgaris*, el contenido de proteínas varía del 14 al 33%, siendo rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína. Sin embargo, de acuerdo con evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína de *Phaseolus vulgaris* cocido puede llegar a ser de hasta el 70% comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100%.

En relación con la aportación de carbohidratos, 100 g de *Phaseolus vulgaris* crudo aportan de 52 a 76 g dependiendo de la variedad, cuya fracción más importante la constituye el almidón. El almidón representa la principal fracción que energiza en este tipo de alimentos, a pesar de que, durante su cocinado, una parte de este queda indisponible dado que se transforma en el denominado almidón resistente a la digestión.

Dentro de los macronutrientes de *Phaseolus vulgaris*, la fracción correspondiente a los lípidos es la más pequeña (1.5 a 6.2 g/100 g), constituida por una mezcla de acilglicéridos cuyos ácidos grasos predominantes son los mono y poliinsaturados.

Phaseolus vulgaris también es buena fuente de fibra cuyo valor varía de 14-19 g/100 g del alimento crudo, del cual hasta la mitad puede ser de la forma soluble. Los principales componentes químicos de la fibra en *Phaseolus vulgaris* son las pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina.

Además, este alimento también es una fuente considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Ulloa, et al., 2011).

Por todo lo anterior, cumple con todos los requisitos mínimos recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o la Organización Mundial de la Salud (OMS). Una porción de 90g de *Phaseolus vulgaris* proporciona 8g de proteína, casi el 15% del consumo diario recomendado para un adulto que pese 70Kg la digestibilidad de esta proteína es del 79% (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017).

Además de ser fuente de proteínas, carbohidratos, fibra y minerales, es rico en compuestos fitoquímicos que proporcionan importantes beneficios para la salud. Ejemplos de tales compuestos son ácidos fenólicos, flavonoides, flavan-3-oles, taninos condensados y antocianinas. También es rico en compuestos antiinflamatorios y antioxidantes que protegen específicamente contra 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), ácido 3-benxotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y peroxil radicales (Soriano Sancho, et al., 2015).

Los flavonoides contenidos en *Phaseolus vulgaris* son compuestos fenólicos que se han reportado actúan como inhibidores del crecimiento tumoral y algunos tipos de cáncer. Estos, junto con los ácidos fenólicos y los taninos, confieren a este alimento una capacidad antioxidante superior. Los principales flavonoides contenidos tanto en *Phaseolus vulgaris* crudo como en el cocido son catequina, kaempferol, quercetina, miricetina y procianidina.

Componentes antinutricionales de *Phaseolus vulgaris*

Como todas las leguminosas, *Phaseolus vulgaris* contiene sustancias "anti fisiológicas" entre las que figuran la rafinosa y la estaquiosa que se fermentan en el intestino y generan gases, taninos, lectinas, anti-tripsinas y saponinas (Delgado Salinas, et al., 2012).

Los inhibidores de tripsina son considerados comúnmente como inhibidores proteolíticos y pueden provocar retardo en el crecimiento e hipertrofia pancreática.

Respecto a los taninos, además de disminuir la digestibilidad de proteínas, limitan la biodisponibilidad de minerales como el hierro y zinc, mientras que el ácido fítico también afecta la asimilación del zinc.

Afortunadamente, las técnicas culinarias de preparación de *Phaseolus vulgaris* para su consumo, como lo son el remojo y la cocción, eliminan o disminuyen radicalmente la presencia de dichos factores anti nutricionales (Ulloa, et al., 2011).

Fitoquímicos presentes en *Phaseolus vulgaris*

Algunos de los fitoquímicos actualmente reconocidos en *Phaseolus* son: fibra, polifenoles, ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina y lectinas.

Compuestos fenólicos

Phaseolus vulgaris es bien conocido como una rica fuente de fitoquímicos, como flavonoides, polifenoles y fenólicos, que exhiben actividades antioxidantes naturales. Los factores que influyen en los niveles de fenoles totales en *Phaseolus vulgaris* incluyen el genotipo, el ambiente, la madurez en la cosecha, el tamaño de la semilla, el peso de la semilla y la edad de la semilla (Sutivisedsak, et al., 2010).

González de Mejía et al., observaron que las mayores cantidades de polifenoles se encontraron en el revestimiento de la semilla de la variedad "Flor de Mayo" de *Phaseolus vulgaris* y representa el 11% del total de la semilla (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017).

Ácidos fenólicos

Alonso et al. mostraron que el ácido ferúlico es el principal ácido fenólico en 62 líneas de *Phaseolus vulgaris* mexicano de tipo silvestre.

Los compuestos fenólicos no flavonoides tales como el ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico se encuentran en el cotiledón, mientras que los flavonoides se encuentran en la capa de la semilla. (Akillioglu et al., 2010).

Los compuestos fenólicos que existen en los frijoles se pueden clasificar como libres, conjugados y enlazados libres, en la Tabla 4 se presentan algunos de los ácidos fenólicos presentes en variedades de frijol.

Tabla 4. Ácidos fenólicos libres en extractos de *Phaseolus vulgaris*.

Compuestos fenólicos	Variedades de frijol	
	Negro($\mu\text{g/g}$)	Dimeta($\mu\text{g/g}$)
Ácido procatecuico	ND	36.86 \pm 0.08
Acido p-hidroxibenzoico	ND	2.00 \pm 0.11
Ácido p-cumárico	194 \pm 0.03	16.53 \pm .08
Ácido ferúlico	ND	18.74 \pm 0.07
Ácido sinapínico	ND	3.01 \pm 0.03
Ácido gálico	184.60 \pm 0.10	ND
Ácido cafeíco	5.92 \pm 0.01	ND

*ND= No Detectado

Flavonoides

El perfil de flavonoides para *Phaseolus vulgaris* negro mexicano de la variedad "Negro San Luis" exhibió un contenido total de flavonoides de 765.50 mg / 100 g de muestra. En esta variedad, los flavonoides más importantes fueron la quercetina 4-O-galactósido, la mirecitina 3-O-glucósido y el kaempferol 3-O-glucósido.

Antocianinas

En México *Phaseolus vulgaris* es uno de los alimentos más importantes en la dieta mexicana, pero a pesar de ser un alimento de alto consumo en nuestro país, el estudio de este ha sido muy escaso, por la poca estabilidad que este tiene principalmente como colorante natural en la industria.

Tabla 5. Contenido de antocianinas presentes en dos variedades representativas de *Phaseolus vulgaris* consumido en México.

Especie de frijol	Contenido de AT en la testa
Frijol negro Jamapa	13.53%
Frijol Mayocoba	6.7%

El contenido de antocianinas totales en diferentes estudios analizados por (Yoshida, et al., 1996) en el grano y la testa del frijol, predomina una mayor concentración en este último mencionado correspondiente a las especies mostradas en la tabla 6.

Tabla 6. Contenido de antocianinas en grano y testa de tres especies de frijol negro.

Especie	Grano entero (%)	Testa (%)
Jalisco	0.0422	1.18
Mesoamérica	0.0593	1.43
Variedades recombinantes	0.0496	1.3

En la tabla 6, se puede observar de acuerdo con las 3 especies analizadas, la especie mesoamericana fue la que dio mejores resultados, tanto en la extracción de antocianinas en el grano como en la testa.

Tabla 7. Contenido de antocianinas en variedades de frijol con relación a sus especies.

Especie	Variedades	Grano entero %	Testa%
Jalisco	Negro Puebla	0.0442	1.31
	Negro 152	0.0376	1.021
Mesoamérica	Negro Jamapa	0.0705	1.814
	Negro Sinaloa	0.0503	1.156
Variedades recombinantes	Negro Altiplano	0.0718	1.728
	Negro Mecentral	0.0388	1.005

(Salinas, et al., 2010)

Las antocianinas en la testa de frijol negro de las variedades estudiadas son de tipo simple y no asiladas, ya que su estructura está formada por el grupo cromóforo y únicamente un azúcar, que es la glucosa. Esta estructura química reduce su uso potencial como colorantes naturales para alimentos, pues son menos estables a cambios de pH que las asiladas; sin embargo, poseen una actividad antioxidante sobresaliente, por lo que las antocianinas del frijol negro pueden considerarse valiosas como agentes antioxidantes.

El contenido total de antocianidina en el rango de 0.01-1.85 mg cianidina 3-glucósido/g en algunas variedades mexicanas.

Perfil de antocianinas en variedades representativas de *Phaseolus vulgaris*

Se reportan 3 tipos de antocianinas en *Phaseolus vulgaris*: delfinidina 3-glucósido (56%), petunidina 3-glucósido (26%) y malvidina 3-glucósido (18%). Espinoza-Alonso et al. estudiaron 62 especies silvestres mexicanas y se identificaron delfinidina, petunidina, cianidina, malvidina, pelargonidina y peonidina como antocianinas principales.

Los resultados reportados por Takeoka et al. (1997), quienes encontraron las mismas antocianinas en *Phaseolus vulgaris* y señalan, al igual que (Yoshida, et al., 1996) a la delfinidina 3-glucósido como la antocianina mayoritaria en frijol negro, seguida por la petunidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido.

(Yoshida, et al., 1996) indicaron que existen diferencias en el perfil de antocianinas entre especies de frijol: así, en *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris* la delfinidina 3-glucósido es la antocianina presente en mayor proporción.

Phaseolus coccineus

Conocido también como: ayocote, ayacote, ayecote, ayocotli, bénju ponju (otomí) limé-gui ba né (chontal) recómari (tarahumara) recamoli (tarahumara), bótil (Chiapas) frijol bótil (Chiapas) frijol tecómare (Chihuahua) patol (Chihuahua) yegua (Jalisco).

Phaseolus coccineus L. se utiliza como alimento humano en estado inmaduro y seco. La especie representa una opción productiva en diferentes regiones de México. Las clases comerciales de grano que más predominan son las de grano grande y colores negros, morados y blancos, éstas son apreciadas y consumidas por comunidades campesinas ubicadas en zonas de cultivo marginadas en tierras altas y ocasionalmente se comercializan en mercados locales. Sin embargo, en algunas regiones de Europa (Holanda y Reino Unido) se llega a consumir más el frijol ayocote que el frijol común en forma de ejote, o mejor conocidas como judías verdes, también se consume en el sur de Italia y en las tierras de Castilla y León, España, donde se utiliza como semilla de color blanco con excelente calidad culinaria. Por ello es necesario contar con tecnología de producción que incluya el desarrollo de variedades mejoradas y su manejo agronómico para diferentes condiciones ambientales (Vargas Vázquez, et al., 2014).

Historia de *Phaseolus coccineus*

Se han encontrado restos arqueológicos de la forma cultivada en Mesoamérica y particularmente en México. De acuerdo con Kaplan y McNeish (1960), los restos más antiguos de *Phaseolus coccineus* se encontraron en las cuevas de Ocampo, Tamaulipas, con una edad entre 5 500 y 7 000 años a.C. como México es el centro de diversidad de *Phaseolus*, la historia geológica de la región tiene relevancia en la evolución del género y sugiere que éste se diversificó con la formación del Eje Neovolcánico Transversal.

Después de la conquista, *Phaseolus coccineus* se introdujo a Europa, donde se enriqueció y diversificó en sus formas culinarias (Debouck, 1984). Actualmente, los frijoles ayocotes se cultivan en Norte y Sur América, Europa, Asia y África. Además, los colores brillantes de sus flores rojas, blancas y rosadas han hecho que se utilice como planta ornamental en Estados Unidos de América y Europa.

Clasificación taxonómica y botánica de *Phaseolus coccineus*

Antes se clasificaba el ayocote cultivado como *Phaseolus coccineus* y el silvestre como *Phaseolus formosus*. Pero, se mostró que no hay diferencias claras entre los dos taxa, y que el ayocote es simplemente la forma domesticada, así que ahora se utiliza el mismo nombre para las dos formas. Los especímenes muestran variación gradual de caracteres tales como tamaño y color de la flor, tamaño de las brácteas, tamaño y pubescencia de las bractéolas.

Tabla 8. Taxonomía del *Phaseolus coccineus*.

Categoría	Frijol	Característica
Reino	<i>Plantae</i>	
Subreino	<i>Traqueobionta</i>	Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>	Plantas con semillas
División	<i>Magnoliophyta</i>	Plantas con flor
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	Dicotiledóneas
Subclase	<i>Rosidae</i>	
Orden	<i>Fabales</i>	
Familia	<i>Fabaceae / Leguminosa</i>	
Genero	<i>Phaseolus L</i>	
Especie	<i>Phaseolus coccineus L.</i>	

En otras partes del mundo esta leguminosa se aprovecha como planta ornamental, debido al gran tamaño y diversidad de colores del estandarte y las alas de la flor, entre los cuales el más atractivo es el rojo escarlata.

Además, también puede usarse como frijol ejotero y actualmente existen variedades registradas con este fin (Ayala Garay, et al., 2006).

Tabla 9. Descripción técnica de *Phaseolus coccineus* L. (RZEDOWSKI & RZEDOWSKI, 2005).

	Característica
Habito y forma de vida	Planta herbácea perenne y enredadera.
Tamaño	Hasta varios metros de largo
Tallo	No muy delgado, se enreda, piloso o casi sin pelos; estípulas lanceolado-oblongas, pequeñas, ciliadas.
Hojas	Con pecíolos de 5 a 10 cm de largo, algo pilosos, folíolos ovado-deltaoideos o elíptico ovados, a veces casi orbiculares, de 6 a 10 cm de largo por 5 a 6 cm de ancho, ápice agudo o largamente acuminado, borde entero, base anchamente cuneada o redondeada, delgados, haz piloso y áspero, envés densamente piloso o a veces sin pelos.
Frutos y semillas	El fruto es una legumbre anchamente falcada (en forma de hoz), fuertemente comprimida, ápice agudo y rostrado, base atenuada, cubierta por pelos largos y rectos o sin pelos.
Flores	De 1 a 2 cm de largo, brácteas lineares o lanceolado-ovadas, grandes y conspicuas, de 10 a 12 mm de largo por 3 a 4 mm de ancho, persistentes, pedicelos de 2 a 3 cm de largo, delgados, sin pelos o densamente pilosos, bractéolas ovales o suborbiculares, con frecuencia tan largas y anchas como el cáliz, verdes, obtusas, sin pelos o muy pubescentes; cáliz anchamente campanulado, de 4 mm de largo, sin pelos o con pelos rectos de base redondeada, dientes inferiores muy cortos y anchos; corola de color rojo brillante, escarlata o naranja, a veces morado-rojizo o blanca, de 1.5 a 2 cm de largo.

Estructura general de *Phaseolus coccineus*

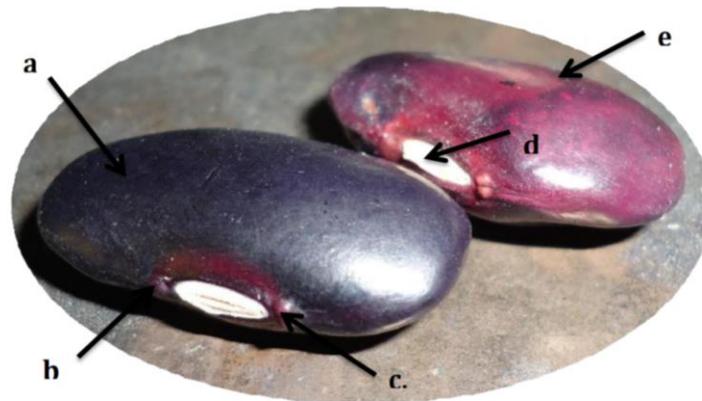


Figura 8. Estructura de *Phaseolus Coccineus*

a) cotiledón b) lente c) micrópilo d) hilum e) testa

Las partes externas más importantes de la semilla se detallan a continuación:

- Testa o cubierta: corresponde a la capa secundina del óvulo (Figura 10).
- Hilum: corresponde a la cicatriz dejada por el funículo; esta última estructura conecta la semilla con la placenta.
- Micrópilo: corresponde a una abertura natural existente en la semilla localizada cerca del hilum; permite la absorción de agua para el proceso de germinación.
- Rafe: corresponde a un lóbulo que proviene de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo.

Bajo la testa, la semilla presenta dos cotiledones y un eje embrionario; éste último está formado por la radícula, el hipocotilo, el epicotilo, la plúmula y las dos hojas primarias o unifoliadas.

Cultivo de *Phaseolus coccineus*

En México, *Phaseolus coccineus* se cultiva como una planta anual o bianual.

En la mayor parte de su zona nuclear, se siembra con maíz y otras variedades o especies (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus polyanthus*) según prácticas documentadas, pues las precipitaciones permiten su asociación. En Durango y Zacatecas, México, bajo condiciones de temporal, se siembra sola, en hileras distantes o esparcida, según el tipo de barbecho. La cosecha manual es aún frecuente; las vainas se recogen y dejan secar al sol antes de golpearlas; los granos se guardan en costales. La estimación del rendimiento en campos de cultivo es difícil, pues los agricultores siembran *Phaseolus coccineus* mezclado con otros frijoles, o lo cosechan periódicamente. Produce 400-1000 kg/ha en las formas arbustivas, mientras que en las volubles el rendimiento podría ser más elevado se han registrado más de 23 t/ha en cultivos para vainas tiernas en Gran Bretaña.

A pesar de las características excepcionales de esta especie, ha sido menos estudiada que el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Sus diferencias morfológicas respecto a *Phaseolus vulgaris* L. son de importancia en cuanto a la producción de semillas ya que el frijol ayocote, debido al mayor grado de polinización cruzada favorecida por los insectos, tiene más probabilidades de ser infectado por patógenos transmitidos por semilla (Vargas-Vázquez, et al., 2011).

Composición química de *Phaseolus coccineus*

Es una leguminosa nativa de México con gran potencial de uso y aprovechamiento con fines alimenticios para la población humana mediante el uso de su follaje, flores, vainas y semillas (Basurto, et al., 1996).

Tabla 10. Composición química del *Phaseolus* (por 100 gramos en base húmeda) *

Variedad	Proteínas	Energía	Grasa	Hidratos de carbono	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Calcio	Hierro
Ayocote	15.0	343	1.7	68.0	0.42	0.19	1.9	116	5.9

*Variedades cultivadas en México. Contenido de humedad 10-12% (Adaptada de H. Bourges Rodríguez, 2008).

Propiedades nutricionales de *Phaseolus coccineus*

100 gramos de *Phaseolus coccineus* nos proporcionan 330 kilocalorías; sólo el 11% de su peso es agua; el 60% de la semilla son carbohidratos.

Phaseolus coccineus proporciona sólo el 1.7 % de lípidos; sin embargo, contiene fibra dietética 5.4%, a base de pectinas y amilopectinas; sus enzimas y sobre todo las fibras mejoran la digestión porque nutren a la microflora intestinal y por lo tanto estimulan al sistema inmunológico.

Proporciona varios minerales, como el calcio, fósforo, hierro, potasio, magnesio, sodio, zinc, selenio (Raúl, 2016).

Componentes anti nutricionales de *Phaseolus coccineus*

Se ha encontrado que las semillas del *Phaseolus coccineus* tienen, como muchas leguminosas, lectinas. Estas moléculas pueden ser nocivas e incluso tóxicas para los animales, incluido el hombre por lo que muchas veces necesitan ser removidos o inactivados por medio de tratamiento con calor o lavados para poder ser utilizados en la dieta.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen específicamente a carbohidratos, no son de naturaleza inmunológica y no presentan actividad enzimática sobre los carbohidratos que reconocen. Las lectinas fueron descritas originalmente por su capacidad de aglutinar células, y se sabe que difieren en su capacidad para reconocer carbohidratos (Acosta-Santoyo, et al., s.f.)

Para la obtención de los resultados es importante hacer mención sobre los métodos que permiten cuantificación de compuestos fenólicos presentes en *Phaseolus* los cuales se mencionan a continuación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El perfil de compuestos fenólicos en *Phaseolus vulgaris* se ha estudiado, esto debido a que es el más consumido en México, *Phaseolus coccineus* y su flor, aunque son consumidos en México su perfil en compuestos fenólicos se desconoce, tomando en cuenta que al igual que el frijol común es una de las 5 especies domesticadas en Centroamérica, por lo cual se considera importante obtener dicha información a fin de enriquecerla.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en el perfil de compuestos bioactivos fenólicos entre especies de frijol: *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris*, sin embargo, el perfil de antocianinas es igual en ambos casos independientemente de la variedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar por métodos cuantitativos y cualitativos los compuestos fenólicos (antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides) presentes en *Phaseolus coccineus* y su flor.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el método de extracción óptimo de compuestos fenólicos para la cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas totales en flor y testa de *Phaseolus coccineus*.
- Identificar compuestos fenólicos (antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides) en flor y testa de *Phaseolus coccineus* a partir de métodos cualitativos. ´

- Analizar el perfil de antocianinas presentes en el *Phaseolus coccineus*, utilizando como referencia *Phaseolus vulgaris*.

ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama general se diseñó para lograr los objetivos.

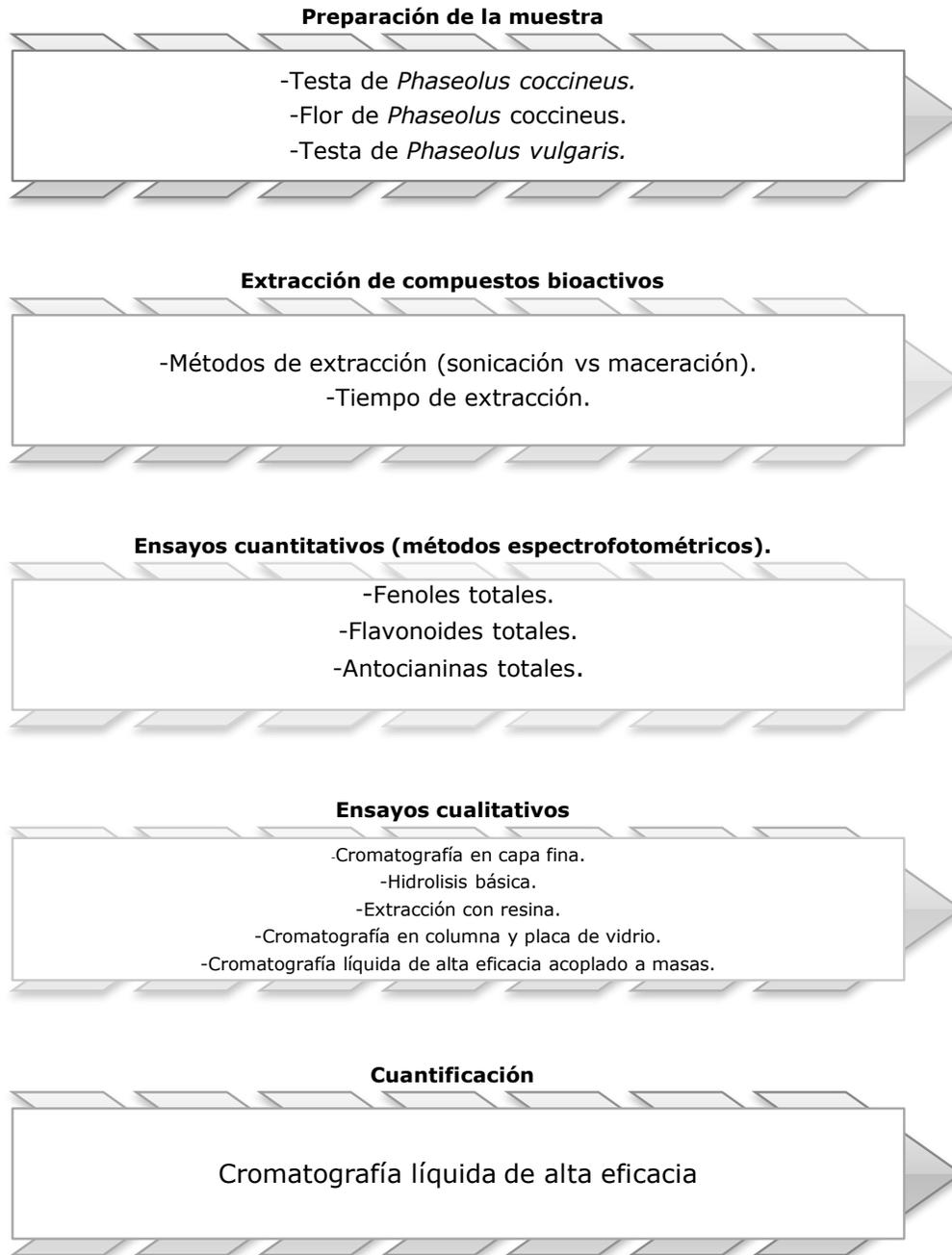


Figura 9. Diagrama general del proyecto.

Preparación de la muestra

Las muestras utilizadas para la realización de este proyecto se compraron a granel en diferentes puntos de venta en la Ciudad de México.

Testa de *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris*: Separación de la testa mediante hidratación del frijol en relación 1:1 (peso/volumen) durante 24 h, en refrigeración, manteniendo el recipiente tapado para evitar cualquier tipo de contaminación. Secado en estufa a 45°C, molida y tamizada (malla 60).

Las muestras de tallos y flores de *Phaseolus coccineus* se obtuvieron del Bosque de Tlalpan, Ciudad de México y la recolección se realizó en un día.

Con las muestras frescas se hizo la separación entre flores y tallos.

Flores y Tallos: liofilización, molienda y tamizado (bajo el mismo proceso que con la testa del frijol). Obtención de muestras homogéneas. Se obtuvo cantidad total de muestra en gramos.

Extracción de los compuestos bioactivos fenólicos

- Extracción de compuestos utilizando dos métodos (maceración y sonicación), en antocianinas totales (Método pH- Diferencial).
- Relación de disolvente para establecer el sistema de extracción más óptimo.

Disolvente metanol:agua:ácido acético (80:20:1) y testa de *Phaseolus*:disolvente, 1:20 (peso/volumen).

Se pesó 1 g de muestra y se adicionó la mezcla de disolvente de acuerdo a la relación propuesta (g muestra/mL de disolvente). Las determinaciones en todos los casos se hicieron por triplicado.

Sonicación: Se sonicaron las muestras por periodos de 15, 30 y 45 min, se tomó en cada periodo de tiempo una alícuota de 5 mL y se filtró para realizar la medición en cada intervalo de tiempo.

Maceración: En un sistema de agitación se colocaron las muestras a 150 revoluciones por minuto, bajo los mismos criterios que en el ensayo de sonicación y se tomaron las muestras en los tres intervalos de tiempo.

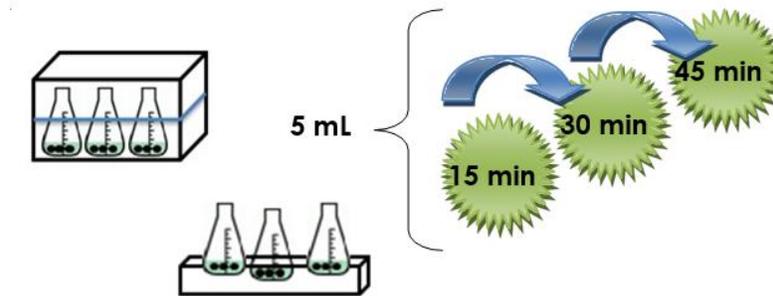


Figura 10. Toma de muestra (5 mL), para el análisis.

Los resultados se reportaron en antocianinas totales (Método pH-diferencial).

ENSAYOS CUANTITATIVOS (ESPECTROFOTOMÉTRICOS)

Se realizaron 3 diferentes métodos para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos.

Fenoles totales (método Folin-Ciocalteu)

La medición se realizó tomando 100 μL del extracto y se adicionó 2000 μL de Na_2CO_3 al 2%, transcurridos 2 min, se agregaron 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (relación 1:1 con agua destilada). Transcurridos 30 min aislado de la luz, se realizó la medición espectrofotométrica a 750 nm, utilizando agua destilada como blanco. La determinación se realizó por triplicado.

- ✓ Curva estándar utilizada: ácido gálico, ácido tánico (mg/mL)
- ✓ Los resultados obtenidos se reportan como mg de ácido por cada 100g de muestra.

Flavonoides totales (Método AlCl₃)

La medición se realizó tomando 100 µL del extracto y se le adicionó 140 µL de agua destilada, 300 µL de NaNO₂ al 5%, transcurridos 5 min se adicionaron 30 µL AlCl₃ al 10%, 200 µL NaOH 1M y 500 µL de agua destilada; la medición espectrofotométrica se leyó a 415 nm. La determinación se realizó por triplicado.

- ✓ Curva estándar utilizada: Catequina (mg/mL).
- ✓ Los resultados obtenidos se reportan como mg de catequina por cada 100 g de muestra.

Antocianinas totales (método pH diferencial)

La medición se hizo tomando 200 µL del extracto obtenido, mezclándose con 1800 µL de buffer de cloruros 0.025 M pH 1 en un tubo de ensaye, y se tomaron otros 200 µL de extracto con 1800 µL de buffer de acetatos 0.4 M pH 4.5. Para cada solución, se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y a 700 nm en un espectrofotómetro UV visible usando agua destilada como blanco. La determinación se realizó por triplicado. La absorbancia final se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$AC = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

$$AT = \frac{AC * PM * FD * 1000}{\Sigma * 1}$$

Dónde:

PM= peso molecular de la cianidina 3-glucósido = 449.2 g/mol

FD = Factor de dilución=10

Σ= absortividad molar de la cianidina 3-glucósido= 26900 L/cm mg

La concentración final se obtuvo en función del volumen de disolvente empleado y peso de la muestra obteniéndose unidades de **mg de antocianinas totales/g de muestra**.

ENSAYOS CUALITATIVOS

Se realizaron diferentes ensayos cualitativos a fin de enriquecer y complementar la caracterización y análisis de compuestos bioactivos fenólicos presentes en *Phaseolus coccineus* y su flor.

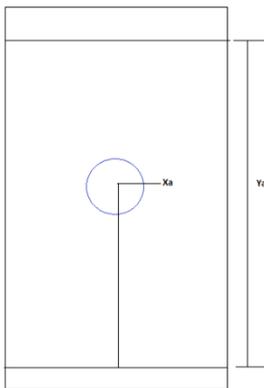
Cromatografía de Capa Fina (CCF)

La fase estacionaria utilizada es gel de sílice (SiO_2) de carácter polar y el proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto o el adsorbente y este no debe reaccionar con las muestras a analizar.

Se utilizó una mezcla de disolventes para cada uno de los diferentes compuestos.

Se realizaron extracciones de cada uno de los métodos de acuerdo con el compuesto fenólico.

La determinación del Rf



Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como Rf y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones

cromatográficas determinadas.

Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión:

$$Rf = \frac{Xa}{Ya}$$

Rf= distancia recorrida por el compuesto (X) / distancia recorrida por el eluyente (Y).

Cromatografía de capa fina en ácidos fenólicos

Fase estacionaria: Silica gel.

Fase móvil: Hexano: diclorometano: acetato de etilo: ácido acético. (1:1:2:0.1) se compararon con los estándares comerciales.

Revelador: Sulfato cérico 3.5%.

Se utilizaron estándares como referencia para el Rf.

Cromatografía de capa fina en flavonoides

Fase estacionaria: Silica gel.

Fase móvil:

Para Quercetina: Diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico (7:1:0.1).

Revelador: Solución metanólica de anisaldehído al 0.5%.

Éstandar comercial al 1%

Cromatografía de capa fina en antocianinas

Fase estacionaria: Silica gel.

Fase móvil: Acetato de etilo: Agua: ácido fórmico en relación (75:20:10) respectivamente.

Hidrólisis básica para la determinación cualitativa de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos

Muestra: Se utilizó el residuo de muestra después de la extracción de compuestos biactivos (maceración y sonicación).

Compuestos fenólicos libres

Se pesó la cantidad de muestra y en relación 1:20 se realizaron dos lavados con hexano en agitación durante 15 minutos aislado de la luz, posteriormente se centrifugó por 10 min.

El residuo se extrajo 3 veces con metanol al 80% (20 mL) por extracción, se centrifuga y el sobrenadante se lleva a sequedad, el extracto seco se disuelve en metanol al 50 %.

A partir del extracto seco, se realizó la identificación por cromatografía de capa fina.

Compuestos fenólicos ligados

El residuo de la extracción de compuestos fenólicos libres en relación 1:20 se le adicionó NaOH 2 M, la muestra se sonicó durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró con ayuda de un embudo Buchner y la solución se ajustó a un pH=3 con ácido clorhídrico. La muestra se centrifugó por 10 minutos a 4°C. Sobrenadante se desengrasó con hexano en un lavado y se realizó una extracción con ayuda de un embudo de separación usando como disolvente acetato de etilo, la fracción de acetato de etilo se concentró, se pesó y se diluyó en metanol en una relación 1:20 para la identificación de los ácidos fenólicos.

Extracción de antocianinas con amberlita

El extracto purificado de antocianinas se obtuvo de la desabsorción de la amberlita con metanol: ácido (100:1). Se pesa y se establece la relación de extracto seco en gramos de muestra inicial.



Figura 11. Proceso de purificación en antocianinas de *Phaseolus*.

Cromatografía en columna preparativa

Del extracto purificado de la flor de ayocote, se pesaron 100 mg con 20 g de gel sílice. Se empacó la columna se utilizó como disolvente la mezcla de acetato de etilo:metanol:cloroformo:ácido fórmico (40:30:20:10). Se obtuvieron las fracciones y se concentraron en el rotavapor, se realizó CCF. La relación mL eluidos/ tiempo fue 1 mL por cada 2 minutos conectado al vacío.

Cromatografía de capa fina en placa de vidrio

Del extracto purificado de flor de *Phaseolus coccineus* obtenido bajo el proceso de extracción con amberlita, se pesaron 40 mg y se adicionó la mínima cantidad de metanol: ácido (100:1). Se utilizaron placas de vidrio de gel de

sílice como fase estacionaria. Fase móvil: Acetato de etilo: Agua: ácido fórmico en relación (75:20:10) de la placa se separaron los compuestos y se pusieron en una solución de metanol: ácido, se agitaron las muestras durante 3 horas, se filtraron y se hizo la concentración de cada extracto con ayuda del rotavapor. A partir de los extractos obtenidos se hace identificación cualitativa.

Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas (HPLC-MS)

De los extractos purificados de flor de *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus coccineus*, variedad negra y morada, se prepararon disoluciones en metanol:ácido y se filtraron antes de inyectarse a través de un acrodisco de 0.45 μm (Millipore, Bedford, MA), inyectando un volumen de 20 μL . Se usaron como disolventes de elución: a) ácido fórmico:agua desionizada:acetonitrilo (0.1:90:10)(v/v/v); y b) acetonitrilo. Lectura de antocianinas a 520nm y compuestos fenólicos a 325nm, bajo el método modificado 8.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

De los extractos purificados de Flor de *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus coccineus*, variedad negra y morada, se prepararon en metanol:ácido y se filtraron antes de inyectarse a través de un acrodisco de 0.45 μm (Millipore, Bedford, MA), inyectando un volumen de 20 μL . Se usaron como disolventes de elución: a) ácido fórmico:agua desionizada:acetonitrilo (0.1:90:10)(v/v/v); y b) acetonitrilo. Lectura de antocianinas a 520nm y compuestos fenólicos a 325nm, bajo el método modificado 8.

EQUIPOS Y MATERIALES

EQUIPOS Y MATERIALES	MODELO	MARCA
Molino	GX4100	KRUAS
Congelador -80°C		Revco Harris
Sonicador	1510, Potencia: 70W, 42KHz	Branson
Espectrofotómetro		CINTRA
Vacuum pump	v-700	Buchi
Rotavapor	R-215	Buchi
Vacuum controller	v-850	Buchi
Heating bath	B-419	Buchi
Polyscience digital 51temperatura controller		
Balanza analítica	AP 1105	OHAUS
Estufa		
Lámpara UV		
Tamiz malla 60		
Liofilizadora	7522900	Labconco
Amberlita XAD-7HP		
Metanol, acetato de etilo, hexano, cloroformo, diclorometano.		
Ácido acético, fórmico		SIGMA
Placas de aluminio de gel sílice		
Silica gel 60	GF ₂₅₄	EMD
Estándares (ácidos hidrixicinámicos)		SIGMA
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)		
Autoinyector	2707	Waters
Bomba	1525	Waters
Detector UV	2478	
Columna Hypersil Gold	250x4.6 mm 52 µL.	

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para cada uno de los resultados se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de cada una de las determinaciones y análisis de pruebas de rango múltiple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Contenido de compuestos bioactivos fenólicos

A fin de mejorar la etapa de extracción sobre el contenido de compuestos bioactivos fenólicos, se realizó una comparación directa entre el método por sonicación y el método por maceración, usando diferentes intervalos de tiempo para estandarizar el proceso de extracción de los compuestos bioactivos fenólicos en *Phaseolus coccineus*, la flor de *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris*.

Condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos.

En esta etapa del proyecto se trabajó bajo condiciones reportadas en estudios previos para la extracción de antocianinas: relación de disolvente (metanol:agua:ácido (80:20:1)), relación soluto: disolvente (1:20), temperatura constante (Torres Alcalá & Navarro Ocaña, 2016).

Extracción de compuestos bioactivos fenólicos (Sonicación vs Maceración).

En la figura 12, se indica que el método de extracción por sonicación es superior al de maceración (se obtuvo un contenido de antocianinas totales en testa de *Phaseolus coccineus* variedad negra de **1.329 mg cianidina 3-glucósido/g muestra** por sonicación y de **1.146 cianidina 3-glucósido/g**

muestra por maceración), obteniendo mejores resultados en tratamiento por sonicación. El incremento de la concentración de antocianinas totales también se vio en aumento con respecto al tiempo de extracción.

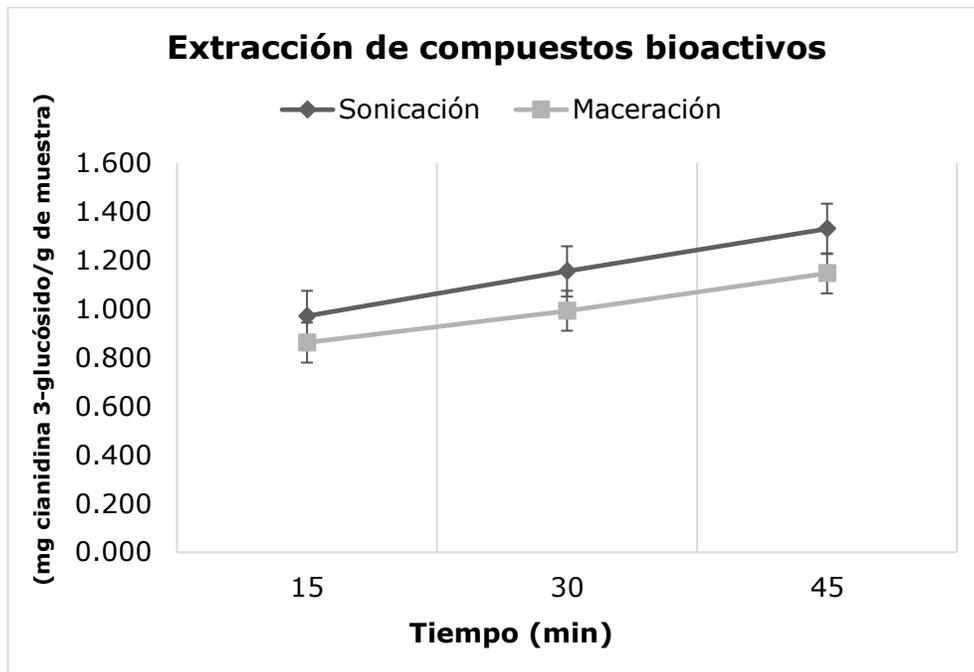


Figura 12. Contenido de antocianinas totales en *Phaseolus coccineus* variedad negra (sonicación vs maceración).

Acorde con los resultados obtenidos reportados en figura 12 el método de extracción a utilizar es extracción por sonicación; a fin de optimizar el proceso se utilizará 30 minutos como el intervalo de tiempo necesario para la extracción de compuestos bioactivos fenólicos; de los resultados obtenidos y las variables propuestas, tales como lo son, las relaciones soluto:disolvente (1:20) y preparación del disolvente $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:1:20 v/v/v), se establece que la extracción de compuestos fenólicos se da de forma eficiente.

La estabilidad de compuestos bioactivos fenólicos depende directamente del medio y el proceso de extracción ya que son poco estables y difíciles de purificar, del medio de extracción utilizado ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:1:20 v/v/v)), influye el efecto del pH para la estabilidad, el núcleo de flavilo es deficiente en electrones y por lo tanto muy reactivo, lo que lo hace muy sensible a cambios de pH, a pH ácidos adquieren una estructura oxonio estable

del catión flavilo colorido, la concentración de ácido utilizado mantiene estable la estructura. Las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol, etanol, (Badui Dergal, 2006). Con base en ello se establece la relación de MeOH: H₂O con fines prácticos de utilizar un buen disolvente como medio de extracción.

A partir de los extractos obtenidos se realizan la determinación cuantitativa de fenoles totales, flavonoides y antocianinas totales.

Ensayos cuantitativos (espectrofotométricos) en *Phaseolus coccineus*

Fenoles totales en *Phaseolus*

Una vez estandarizado el proceso de extracción en compuestos bioactivos fenólicos se realizaron las mediciones para *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris*, a fin de cuantificar el contenido total de fenoles utilizando el método Folin-Ciocalteu.

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para fenoles totales en muestras de *Phaseolus*, para hacer una comparación con *Phaseolus coccineus* se realizó la determinación de *Phaseolus vulgaris* variedad negra Jamapa bajo las mismas condiciones experimentales.

Se cuantificaron 5 muestras diferentes, donde 4 de ellas corresponden a variedades de *Phaseolus coccineus* y una más que corresponde a *Phaseolus vulgaris* variedad negra Jamapa, aunque existe información sobre *Phaseolus vulgaris* respecto a su contenido en compuestos fenólicos; el que se determine bajo las mismas condiciones experimentales nos permite hacer una comparación directa.

Tabla 11. Contenido de fenoles totales en *Phaseolus*.

Muestras	Contenido de Fenoles Totales
	mg ácido gálico/g muestra seca
<i>Phaseolus coccineus</i> morado intenso	195.27±3.68 ^a
<i>Phaseolus coccineus</i> morado lila	189.82±0.80 ^a
<i>Phaseolus coccineus</i> morado fuerte	178.06±10.50 ^{ab}
<i>Phaseolus coccineus</i> negro	158.50±15.73 ^b
<i>Phaseolus vulgaris</i> negro Jamapa	168.48±18.75 ^b

*La letra indica diferencia significativa entre las muestras.

Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 12, se analizaron con un ANOVA donde se indica que si existe una diferencia significativa entre las muestras en relación con el contenido de fenoles totales por lo tanto se realizó una prueba de rangos múltiples para determinar sobre que muestras existe dicha diferencia, se obtuvo que *Phaseolus coccineus* intenso, lila y fuerte que son de coloración morada no presentan diferencia significativa, lo que nos indica que independientemente de la intensidad del color el contenido de fenoles totales no presenta diferencia teniendo que como promedio 187.72 mg ácido gálico/g muestra seca, en comparación con la muestra de *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa no existe diferencia significativa con las muestras de *Phaseolus coccineus* variedad negra y *Phaseolus coccineus* variedad morado intenso, obteniendo un promedio 171.68 mg ácido gálico/g muestra seca, pero con respecto a las otras muestras si existe diferencia, de los valores obtenidos y comparados con los valores (Cardador-Martínez, et al., 2002) reportan un contenido de compuestos fenólicos de 145 mg ácido gálico/g muestra en extracto metanólico de "frijol de mayo"; *Phaseolus coccineus* se encuentra dentro del promedio sobre el contenido de fenoles totales en *Phaseolus*, por lo cual el estudio y análisis de dichos compuestos pueden proporcionar datos relevantes que nos permitan conocer el perfil de compuestos bioactivos del frijol ayocote en variedades morada y negra. El almacenamiento, así como el tiempo de este, influyen sobre el contenido total de fenoles totales presentes.

Flavonoides totales en *Phaseolus*

Como ya se mencionó anteriormente dentro del grupo de compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides los cuales se sabe que están contenidos en variedades de *Phaseolus* donde se ha reportado que actúan como inhibidores del crecimiento tumoral y algunos tipos de cáncer, esto junto con compuestos fenólicos le confieren a este alimento una capacidad antioxidante superior, por ello la importancia de su determinación. (Cardador-Martínez, et al., 2002) (Huber, et al., 2016). En esta etapa del proyecto los compuestos se cuantificaron bajo la metodología antes propuesta, se reporta como mg de catequina/ g muestra seca.

Se reporta que en variedades de *Phaseolus vulgaris* mexicano variedad "Negro San Luis" presenta un contenido de flavonoides totales de 7.65 mg/g muestra, identificándose como quercetina 4-O-galactósido, myrecitina 3-O-glucosido y Kampferol 3-O-glucósido (Guajardo-Flores, et al., 2012).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides totales:

Tabla 12. Contenido de flavonoides totales en *Phaseolus*.

Muestras	Contenido de Flavonoides Totales
	mg catequina/g muestra seca
<i>Phaseolus coccineus</i> morado lila	19.72±1.71 ^a
<i>Phaseolus coccineus</i> morado fuerte	30.55±2.56 ^b
<i>Phaseolus coccineus</i> morado intenso	36.60±2.92 ^b
<i>Phaseolus vulgaris</i> negro Jamapa	60.19±3.43 ^c
<i>Phaseolus coccineus</i> negro	66.19±6.42 ^c

*La letra indica la diferencia significativa entre las muestras.

Estos compuestos presentan una alta actividad biológica, por ello la importancia de su estudio y cuantificación dentro del proyecto, el estudio se realizó en la testa de *Phaseolus*, es importante mencionar ya que es en este componente donde se encuentra la mayor cantidad de flavonoides. La tabla

13 nos permite visualizar el contenido de flavonoides totales, donde a partir de los mismos se realizó un ANOVA y se obtuvo que existe diferencia significativa en las muestras, posteriormente se realizó una prueba de rango múltiple y se obtuvo que para *Phaseolus coccineus* variedad morado lila el contenido de flavonoides si depende de la variedad es decir del color de la muestra, ya que se reportó un 19.72 ± 1.71 mg catequina/ g muestra seca, el valor más bajo determinado respecto a las otras muestras, *Phaseolus coccineus* variedad morado fuerte e intenso no presentan diferencia significativa esto nos indica que no es necesario la selección de color ya que el valor obtenido no presenta diferencia significativa y por tanto se puede considerar como una sola muestra, *Phaseolus vulgaris* variedad negra Jamapa y el *Phaseolus coccineus* variedad negra no muestran diferencia significativa lo que nos muestra que la determinación sobre el contenido de flavonoides totales está relacionado directamente con el color de las muestras.

Posterior se determina el contenido de antocianinas totales, principales compuestos de interés.

Antocianinas totales en *Phaseolus*

Recordando, las antocianinas se clasifican como compuestos fenólicos, particularmente como flavonoides, por ello la determinación previa de dichos compuestos. Confieren color a la capa de *Phaseolus* (testa), la preparación de la muestra consiste en retirar solo la testa a fin de facilitar el proceso de extracción de los compuestos y tener una menor interferencia por la interacción con otros compuestos.

El contenido de antocianinas totales en las diferentes muestras se presenta en la tabla 14; dónde en la muestra de *Phaseolus coccineus* negro se señala un mayor contenido de dichos compuestos, esto a su vez se relaciona con la madurez de la planta, condiciones climáticas y procedencia de la muestra, siendo una fuente importante para la obtención de dichos compuestos.

El contenido de antocianinas totales para variedades de frijol mexicano se encuentra en un rango de 0.01-1.85 mg de cianidina 3-glucósido/ g de muestra (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017). Los resultados obtenidos en este proyecto se reportan en la tabla 14.

Tabla 13. Contenido de antocianinas totales en muestras de *Phaseolus*.

Muestras	Contenido de Antocianinas Totales
	mg cianidina 3-glucósido /g muestra seca
<i>Phaseolus coccineus</i> morado lila	0.53±0.04 ^a
<i>Phaseolus coccineus</i> morado fuerte	0.91±0.07 ^b
<i>Phaseolus coccineus</i> morado intenso	1.18±0.03 ^c
<i>Phaseolus vulgaris</i> negro Jamapa	1.23±0.06 ^c
<i>Phaseolus coccineus</i> negro	1.45±0.08 ^c

*La letra indica la diferencia significativa entre las muestras.

La determinación de antocianinas totales del proyecto entra dentro del rango de estudios previos, sin embargo un ANOVA nos indica que existe diferencia significativa entre las muestras es decir, que el contenido de antocianinas totales depende de la muestra, por ello se realizó una prueba de rango múltiple para determinar que muestras presentan diferencias, *Phaseolus coccineus* variedad morado lila, como se mencionó en el contenido de flavonoides totales depende directamente del color de la testa, recordemos que dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las antocianinas por tanto se relacionan ambos valores, lo mismo para el caso de *Phaseolus coccineus* variedad morado fuerte, sin embargo quienes no representan una diferencia significativa son las muestras de *Phaseolus coccineus* variedad morado intenso, negra y *Phaseolus vulgaris* variedad negra Jamapa, teniendo un contenido de antocianinas promedio de 1.29 mg de cianidina 3-glucósido/g muestra seca.

Resultados generales en la determinación de compuestos bioactivos fenólicos en *Phaseolus*

Las determinaciones que se realizaron anteriormente para cada una de las muestras se reportan en la tabla 15.

Tabla 14. Resultados generales en la cuantificación de compuestos bioactivos en testa de *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa y *Phaseolus coccineus* variedad morado y negro.

Muestra	Fenoles Totales (mg ácido gálico/g)	Flavonoides Totales (mg catequina/g)	Antocianinas Totales (mg cianidina 3-glucósido/g)
<i>Phaseolus coccineus</i> morado lila	189.82±0.80 ^a	19.72±1.71 ^a	0.53±0.04 ^a
<i>Phaseolus coccineus</i> morado fuerte	178.06±10.50 ^{ab}	30.55±2.56 ^b	0.91±0.07 ^b
<i>Phaseolus coccineus</i> morado intenso	195.27±3.68 ^a	36.60±2.92 ^b	1.18±0.03 ^c
<i>Phaseolus vulgaris</i> negro Jamapa	168.48±18.75 ^b	60.19±3.43 ^c	1.23±0.06 ^c
<i>Phaseolus coccineus</i> negro	158.50±15.73 ^b	66.19±6.42 ^c	1.45±0.08 ^c

*La letra indica la diferencia significativa entre las muestras.

Podemos hacer la diferenciación de las muestras, donde *Phaseolus coccineus* se clasifica de forma general como variedad morada, *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa y el *Phaseolus coccineus* variedad negra.

Dichos resultados como ya se mencionó anteriormente se encuentran dentro de los parámetros reportados en la literatura en el estudio de otras variedades, lo cual nos indica que *Phaseolus coccineus* es una fuente importante de dichos compuestos, como parte de los objetivos se planteó identificar dichos compuestos que corresponde a etapas posteriores del presente proyecto.

Ensayos cualitativos en *Phaseolus coccineus*

En conjunto con la determinación cuantitativa se desarrolló un método de cromatografía de capa fina y otro para la identificación por CLAR y CLAR-MS de antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides de tal manera que se obtenga información útil para la identificación de dichos compuestos de forma cualitativa.

En esta etapa del proyecto mediante un método cualitativo se identificaron algunos de los compuestos mayoritarios presentes en *Phaseolus coccineus* en variedades morada y negra esto a fin de establecer si se presenta un mismo perfil de compuestos entre las variedades antes ya mencionadas.

Cromatografía en capa fina (CCF) en *Phaseolus*

Esta técnica utilizada permite hacer una evaluación sencilla, rápida y a un bajo costo, para realizar su análisis además de la coloración o el revelador utilizado es importante conocer el R_f, podemos hacer una comparación directa con muestras de las que ya se conoce su perfil o bien el estándar comercial.

Antocianinas en *Phaseolus*

Se trabajó con el extracto de cada uno de los diferentes compuestos fenólicos, en todos los casos se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y para antocianinas se utilizó como fase móvil: Acetato de etilo: Agua: ácido fórmico en relación (75:20:10) respectivamente, el eluyente o la fase móvil fue agregada a la cámara cromatográfica, dejandola en reposo unos minutos; se colocó la placa, tomando en cuenta de que el borde inferior de la placa estuviera sumergido sin tocar las muestras colocadas, se dejó eluir hasta que estuviera a un centímetro del borde superior.

En la figura 14 se observan diferentes coloraciones que corresponden a cada una de las antocianinas descritas, la muestras 5 y 6 que corresponden a *Phaseolus coccineus* variedad negra y morada respectivamente, se observa

que hay presencia de 5 antocianinas con coloraciones azul, morado, rosa para ambos casos, lo cual ya nos indica que en ambas variedades el perfil es el mismo, la cianidina y malvidina presentan una coloración entre rosa y morada, en cambio la pelargonidina una color roja-naranja y finalmente la delphinidina una coloración azul, dados los colores presentes en las muestras podemos decir que hay presencia de los compuestos antes mencionados a excepción de la pelargonidina; como se mencionó anteriormente para el caso de *Phaseolus vulgaris* la antocianina mayoritaria es la delphinidina 3-glucósido; ésta estructura química posee una actividad antioxidante sobresaliente, por lo que las antocianinas de *Phaseolus vulgaris* negro pueden considerarse valiosas como agentes antioxidantes.

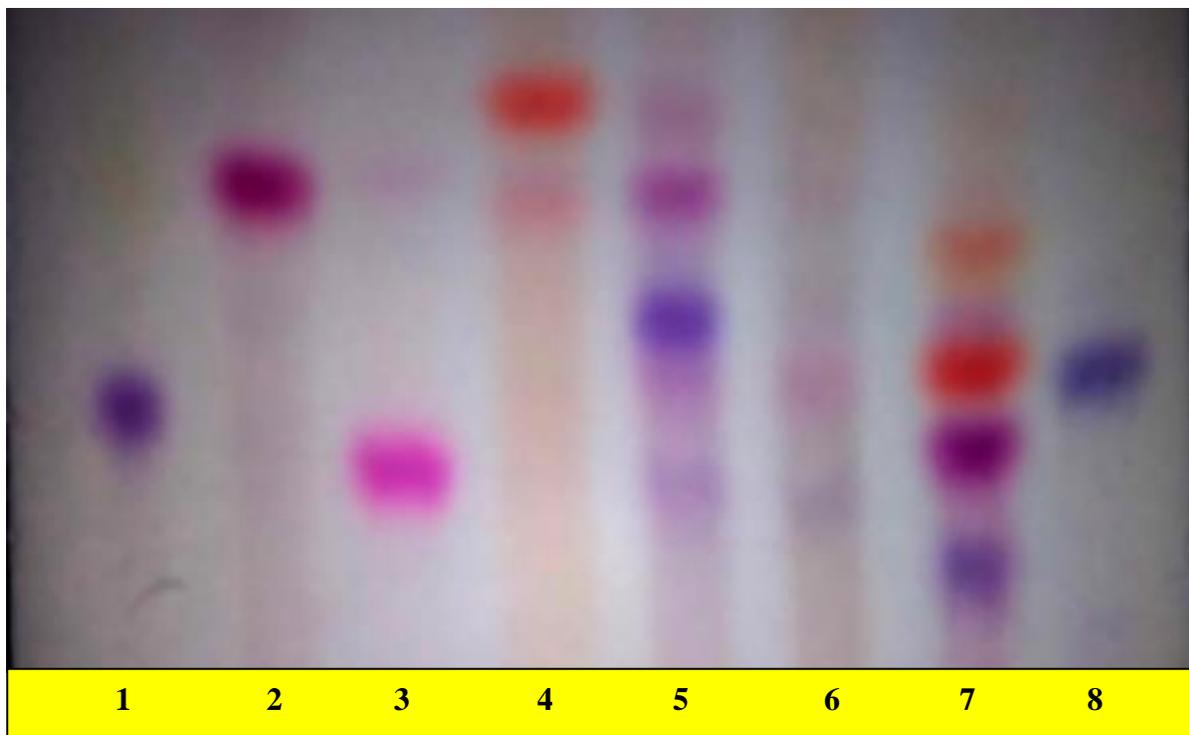


Figura 13. Cromatografía en capa fina de gel sílice.

1 y 8) Delphinidina 3-glucósido **2)** Cianidina 3-glucósido **3)** Malvidina 3 – glucósido y derivado **4)** pelargonidina 3 – glucósido y derivado **5)** *Phaseolus vulgaris* negro Jamampa **6)** *Phaseolus coccineus* morado **7)** flor de *Phaseolus coccineus*

La coloración que presenta cada una de las antocianinas no proporciona información sobre la sustitución de la antocianidina, por ello es importante que se determine a que Rf corresponde cada una y comparar con muestras conocidas o bien clasificarla de acuerdo con este valor. El Rf calculado de cada una de las muestras se reporta en la tabla 16.

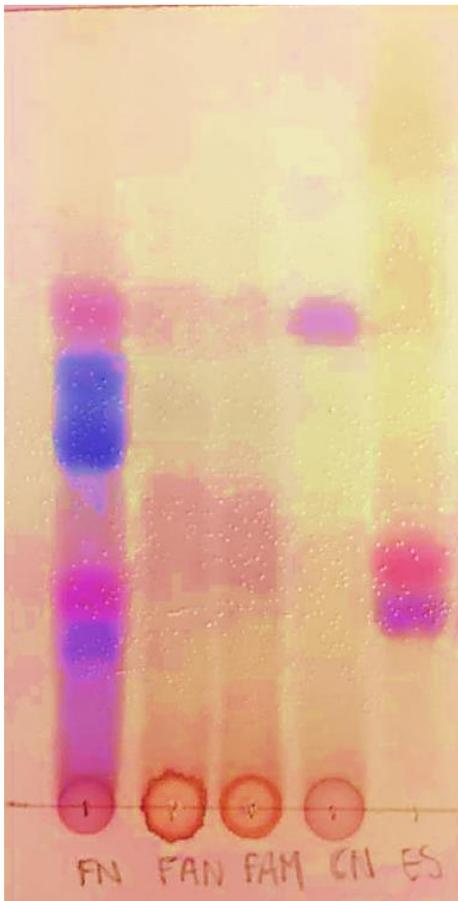
Tabla 15. Rf calculado en extractos de antocianinas analizadas.

Antocianina	Fuente	Rf
Delfinidina 3-glucósido	Berenjena	0.54
Cianidina 3-glucósido	Vaina China	0.68
Malvidina 3 -glucósido y derivado	Extracto purificado	0.68 0.51
Pelargonidina 3 -glucósido y derivado	Fresa	0.76
<i>Phaseolus coccineus</i>	Testa	0.74
		0.68
		0.62
		0.58
		0.51

Los resultados obtenidos a partir del cálculo de Rf's muestran el orden de elución de cada una de las muestras, con estos valores podemos empezar a hacer una comparación directa sumando a ello las coloraciones a fin de determinar de manera cualitativa de que compuesto se trata, por lo tanto, se observa que los Rf's que coinciden entre si son cianidina 3-glucósido 0.68 al igual que la malvidina 3-glucósido, dada la coloración de la muestra podemos decir que es cianidina ya que en CCF es morada.

Una vez identificadas la cantidad de antocianinas presentes en la muestra de *Phaseolus coccineus*, de las cuales se saben son 5, se realizó otra CCF con la muestra de *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa para conocer si dichas antocianinas son iguales en ambos, de acuerdo con la figura 15, se observa

en FN que corresponde al *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa, hay presencia de 5 antocianinas al menos lo que se observa por color en la CCF, las muestras seguidas que se muestran corresponden a las variedades de *Phaseolus coccineus*, donde las 3 primeras de arriba hacia abajo son iguales entre sí.



Por coloración podemos observar que la cianidina 3-glucósido corresponde con el *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa y *Phaseolus coccineus* en ambas variedades.

Para la identificación de otros posibles compuestos presentes en el frijol se utilizó como referencia la espinosilla de donde se sabe las antocianinas cianidina y delfinidina 3-5-diglicósido y se observa que corresponden a las muestras presentes en *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa.

Figura 14. Cromatografía en capa fina de extractos de muestras para analizar.

Posteriormente para confirmar dicha información se hace la comparación del Rf y se realizó otra CCF (Figura 16). El Rf calculado para las muestras de la figura 16 corresponden entre sí, siendo los valores 0.31 y 0.26, teniendo así que ambos compuestos corresponden a la muestra de *Phaseolus vulgaris*.

Dados los resultados obtenidos tenemos que se han identificado en las muestras de frijol la delfinidina 3-glucósido, cianidina 3-glucósido y sus derivados diglicosidos.

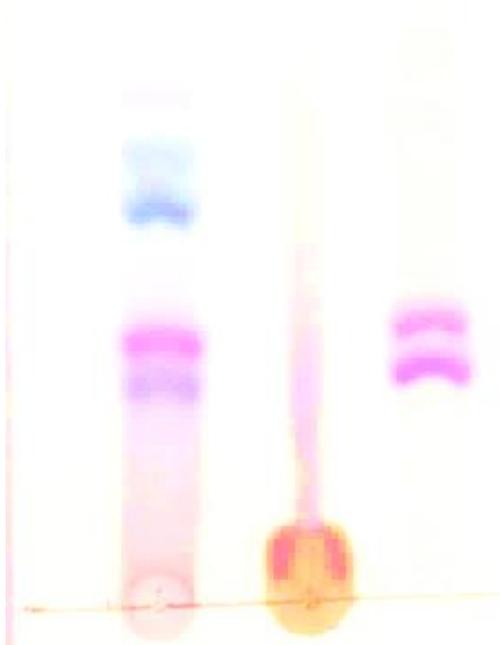


Figura 15. Extracto de *Phaseolus vulgaris* negro Jamapa y cianidina y delphinidina 3-5-diglicósido.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a masas: Antocianinas en *Phaseolus coccineus*

A fin de comparar los resultados obtenidos anteriormente se utiliza este método para la identificación de antocianinas, partiendo de los extractos enriquecidos de antocianinas de las diferentes muestras.

En la tabla 17 se muestra el patrón de fragmentación de acuerdo con su antocianina correspondiente, la información obtenida en CCF y HPLC se complementan a fin de establecer el perfil en compuestos bioactivos (antocianinas).

Tabla 16. Antocianinas en *Phaseolus coccineus* y su patrón LC-MS.

Antocianina	[M+H] ⁺	Fragmento
Delfinidina 3-glucósido	465	303
Cianidina 3-glucósido	449	287
Petunidina 3-glucósido	479	317
Cianidina 3,5-diglucósido	611	287

De los resultados obtenidos por HPLC-MS podemos confirmar la información previa por CCF, en el caso de la petunidina no se contaba con una fuente de donde se pudiera hacer la comparación por CCF sin embargo dicho compuesto se encuentra presente en *Phaseolus vulgaris* de acuerdo con lo descrito en la literatura.

Resultados generales en la determinación de antocianinas por CCF y HPLC en *Phaseolus coccineus*

Las determinaciones que se realizaron anteriormente para cada una de las muestras por CCF y HPLC se reportan en la tabla 18.

Tabla 17. Resultados generales en la cuantificación de análisis en CCF por RF'S, coloraciones, en testa de *P. vulgaris* negro Jamapa y *P. coccineus* variedad morada y negra, así como otras muestras con antocianinas ya identificadas y la identificación por HPLC-MS en *P. Coccineus*.

Antocianina	Muestras	
	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Delfinidina 3-glucósido	X	X
Cianidina 3-glucósido	X	X
Malvidina 3 -glucósido	X	
Petunidina 3 -glucósido	X	
Delfinidina 3,5-diglucósido		X
Cianidina 3,5-diglucósido	X	X

La CCF permitió hacer la identificación de antocianinas de una forma en la que es fácil poder hacer una interpretación de los resultados, de manera rápida y se logró hacer la comparación de varias muestras en un mismo lapso.

Identificación de ácidos fenólicos en *Phaseolus coccineus*

Para la identificación se hizo la extracción de fenoles libres y fenoles ligados, los cuales de forma cualitativa se observaron en la CCF. Los compuestos fenólicos se encuentran del 20 al 30 % en forma libre (interacción con otras moléculas por enlaces débiles como puentes de hidrogeno o interacciones hidrofóbicas), y del 70 al 90 % se encuentran en forma ligada (unidos a celulosa, hemicelulosa, pectinas, etc.).

Al realizar la hidrólisis básica con los extractos obtenidos se puede hacer la identificación de forma cualitativa de compuestos fenólicos.

Para la fase móvil se utilizó una mezcla de disolventes: hexano: diclorometano: acetato de etilo: ácido acético. (1:1:2:0.1) y se compararon con los estándares comerciales.

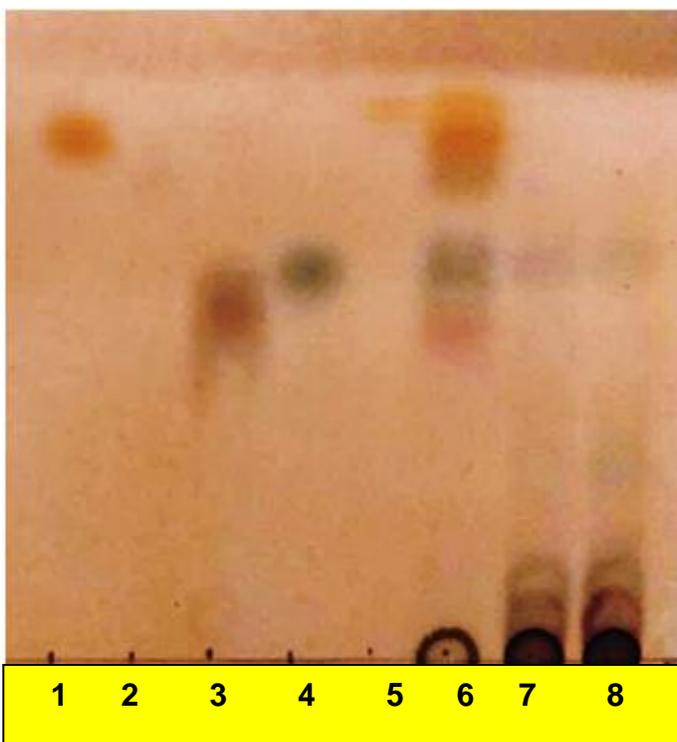


Figura 16. Cromatografía en placa fina para compuestos fenólicos, revelador cloruro férrico.

- 1) ácido p-cumárico
- 2) ácido ferúlico
- 3) ácido sinápico
- 4) ácido 3,4-dihidroxi benzoico
- 5) ácido p-hidroxi benzoico
- 6) Flor de *Phaseolus coccineus*
- 7) *Phaseolus vulgaris negro*
- 8) *Phaseolus coccineus morado*

En la figura 17 se usaron estándares de ácidos fenólicos y se compararon con las muestras de interés; los compuestos que se encontraron presentes en las muestras (*Phaseolus coccineus* variedad morada y negra) por CCF son: ácido procatecuico (Rf 0.66) , ácido p-hidroxibenzoico (Rf 0.92), ácido ferúlico (Rf 0.80), la coloración es un indicativo sobre si son el mismo compuesto y esto a su vez se puede comparar con los Rf´s correspondientes a cada muestra; sin embargo, en la placa se observa que están presentes otros compuestos fenólicos, los ácidos identificados, son los que se reportan en la literatura que se encuentran en mayor proporción en *Phaseolus*.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): ácidos fenólicos en *Phaseolus coccineus*

A fin de contrastar los resultados obtenidos anteriormente se utiliza este método para la identificación de ácidos fenólicos, partiendo de los extractos obtenidos a partir de la extracción de compuestos libres y ligados.

En la tabla 19 se muestra a que ácido fenólico corresponde, la información obtenida en CCF y HPLC se complementan a fin de establecer el perfil en compuestos bioactivos (ácidos fenólicos).

Identificación parcial de compuestos fenólicos presentes en *Phaseolus coccineus*.

Compuestos fenólicos

Para su identificación la muestra se disolvió en metanol (MeOH) grado HPLC y se inyectó la muestra a una lectura de 325nm.

Los resultados que se muestran a continuación son sobre el perfil de compuestos que se identificaron en las diferentes muestras. En la figura 18 se realizó una comparación entre las dos variedades de frijol ayocote (morado y negro) donde se establece que presentan un mismo perfil de compuestos fenólicos.

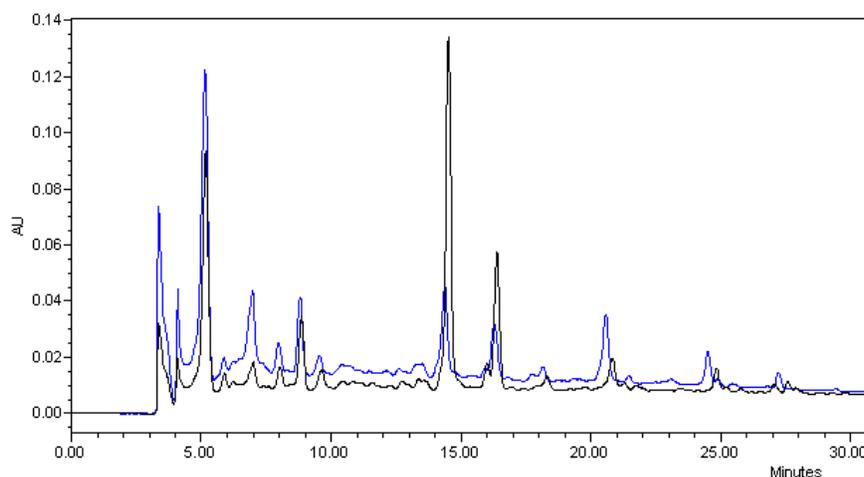


Figura 17. Muestras de *Phaseolus coccineus* variedad morada y negra, presentan el mismo perfil de compuestos fenólicos.

Tabla 18. Tiempo de retención de ácidos fenólicos por HPLC en *Phaseolus coccineus*.

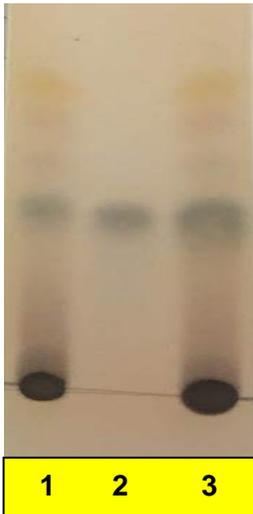
Ácidos fenólicos	tr (min)
Ácido p-hidroxibenzoico	8.8
Ácido protocatecuico	5.7

A partir del análisis cualitativo para antocianinas se determinó que su perfil era el mismo, para el caso de compuestos fenólicos, de igual forma se presenta un mismo perfil, donde la concentración de estos compuestos es la diferencia y por ello dichas coloraciones.

Para la identificación de compuestos mayoritarios que se observaron en las placas por CCF, se usó el estándar comercial y se cotejó con la muestra, se reporta la presencia de dos ácidos, el ácido p-hidroxibenzoico y el ácido protocatecuico.

Identificación de flavonoides en *Phaseolus coccineus*

Para la identificación se utilizó como referencia *Phaseolus coccineus* negro, las CCF se realizaron con extractos sin y con hidrolisis, uno de los compuestos mayoritarios que se encontraron fue quercetina y la CCF se muestra en la figura 19.



En la figura 19 se utilizó una muestra de *Phaseolus coccineus* negro (1), una forma de conocer por CCF si el compuesto de interés corresponde, es juntar las muestras (3) y se compara con el estándar (2), en el caso de la quercetina se observa que la elución fue la misma, por tanto, el compuesto se encuentra presente en las muestras.

Figura 18. Cromatografía en capa fina para quercetina en *Phaseolus coccineus* variedad negra.

Cuantificación de antocianina en *Phaseolus coccineus*

La última etapa del proyecto establece la cuantificación del compuesto mayoritario presente en *Phaseolus coccineus* es por ellos que mediante HPLC se hace la determinación sobre el contenido de cianidina 3- glucósido, donde se obtuvo que el contenido es de 0.235 mg de cianidina 3-glucósido por cada gramo de testa de frijol y 0.056 mg de cianidina 3-glucósido por cada gramo si es en el grano entero.

Ligado a la determinación de compuestos fenólicos en muestras de *Phaseolus*, se determinó el contenido de estos en flor de *Phaseolus coccineus*, debido a que se considera un alimento y su estudio permite conocer si tiene uso potencial como alimento o para la extracción y purificación de dichos compuestos; los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Ensayos cuantitativos (espectrofotométricos) en flor de *Phaseolus coccineus*

Se sabe que, en México, las flores de *Phaseolus coccineus* si son consumidas como alimento, sin embargo, no existen reportes sobre sus características como alimento funcional. En este proyecto se estudió su contenido en compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides totales, así como la identificación de algunos de los compuestos por HPLC y HPLC acoplado a masas.

Para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos presentes en flor de *Phaseolus coccineus*, se trabajó bajo la misma metodología que en *Phaseolus* y los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 20.

La muestra recolectada en el bosque de Tlalpan de la Ciudad de México, se liofilizó, molió y tamizó a fin de tener una muestra homogénea, posterior a esto, la extracción de compuestos se realizó pesando 1g de muestra y se adicionaron 20 mL de la mezcla de disolvente MeOH: H₂O: ácido acético (80:20:1) y se sonico durante 30 minutos, posteriormente se filtró y de lo filtrado se tomaron las alícuotas correspondientes de acuerdo con la medición, a partir de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 19. Contenido de compuestos fenólicos en flor *P. coccineus*.

Muestra	Fenoles Totales (mg GAE/g)	Flavonoides Totales (mg catequina/g)	Antocianinas Totales (mg cianidina 3-gluc/g)
Flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	514.50	62.00	7.30

Los resultados mostrados se compararon junto con valores reportados en la literatura de otras flores comestibles, con el fin de hacer una comparación directa que nos permita conocer acerca de los posibles usos y/o aprovechamiento de dicha flor, tomando en cuenta que al igual que *Phaseolus* contiene compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados y optimizados.

Fenoles totales en flor de *Phaseolus coccineus*

La determinación se realizó de acuerdo con el método Folin-Cicalteu, descrito anteriormente, en la tabla 21 se reportan los resultados de las concentraciones de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico equivalente/ g muestra.

El valor obtenido en este proyecto para flor de *Phaseolus coccineus* fue de 514.50 mg ácido gálico/ g muestra; haciendo la comparación con los valores reportados para otras flores, se observa que existe diferencia entre las muestras de acuerdo al tipo de flor, una de las flores que presenta un mayor contenido de dichos compuestos es *Tropaeolum majus* L. naranja (917.05±10.36) mg ácido gálico/ g muestra comparado con la flor *Dahlia spp.* púrpura (127.5 mg ácido gálico/ g muestra) los contenidos suelen ser muy variables dependiendo del vegetal estudiado y factores como la extracción y procesamiento previo a la extracción, sin embargo, los compuestos fenólicos están relacionados con algunas características sensoriales de los alimentos, incluyendo el color (Martínez-Valverde Isabel, et al., 2000). Esto se puede observar a partir de los resultados reportados para distintas flores comestibles.

Tabla 20. Contenido de fenoles totales en flores comestibles.

Muestras	Contenido de Fenoles Totales	Referencia
	mg ácido gálico/g muestra seca	
Flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	514.50	(Barrientos, C., 2018)
<i>Tropaeolum majus</i> L. amarilla	442.02±5.09	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Tropaeolum majus</i> L. naranja	917.05±10.36	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Tropaeolum majus</i> L. roja	799.35±10.77	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Dahlia spp.</i> púrpura	127.5	(Lara-Cortés, et al., 2014)

Dentro del contenido de compuestos fenólicos está presente otro grupo que resulta de gran relevancia dadas sus características como antioxidante.

Flavonoides totales en flor de *Phaseolus coccineus*.

Los flavonoides poseen una gran capacidad antioxidante como resultado de su estructura química, ya que presentan la capacidad de secuestrar radicales libres; los valores que se reportan para el contenido de flavonoides totales se expresan como mg de catequina / g de muestra, el contenido de flavonoides para la flor de *Phaseolus coccineus* fue de 62 mg catequina/ g muestra, lo cual si hacemos la comparación respecto al valor de compuestos fenólicos representa un 12%, el cual se considera como un porcentaje alto ya que dentro de estos compuestos, están las antocianinas que son compuestos de interés por su uso potencial como colorantes.

Respecto al contenido en otras flores comestibles se observa que de acuerdo con la coloración su contenido varía y no hay un rango, existen muchos factores por los cuales estos valores se ven afectados.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides totales:

Tabla 21. Contenido de flavonoides totales en flores comestibles.

Muestras	Contenido de Flavonoides Totales	Referencia
	mg catequina/g muestra seca	
Flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	62	(Barrientos, C., 2018)
<i>Tropaeolum majus</i> L. amarilla	0.867	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Tropaeolum majus</i> L. naranja	1.185	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Tropaeolum majus</i> L. roja	2.184	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>Dahlia spp.</i> púrpura	127.5	(Lara-Cortés, et al., 2014)

Antocianinas totales en flor de *Phaseolus coccineus*

A continuación se reporta el contenido de antocianinas totales expresado como mg de cianidina-3-glucósido/ g muestra seca, donde se obtuvo un valor de 7.30 mg cianidina 3-glucósido /g muestra seca para la flor de *Phaseolus*

coccineus, dicho valor se compara de manera directa con valores de flores comestibles que se reportan en la literatura, teniendo así que la flor de *Phaseolus coccineus* es una fuente importante de dichos compuestos ya que se encuentra dentro del rango de otras flores que se consideran con un alto contenido en compuestos bioactivos.

Sobre el contenido de antocianinas totales en flores comestibles, se observa que *Dhalia spp. púrpura* y *Dhalia spp. roja*, aunque pertenecen a una misma especie, su contenido de antocianinas totales no es el mismo, comparado con la flor de *Phaseolus coccineus* tenemos que el contenido de antocianinas es equivalente y podemos hacer una optimización de dichos compuestos.

Tabla 22. Contenido de antocianinas totales presentes en flores comestibles.

Muestras	Antocianinas totales mg cianidina 3- glucósido /g muestra seca	Referencia
Flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	7.30	(Barrientos, C., 2018)
<i>Tropaeolum majus L.</i> <i>naranja</i>	0.827	(Arellano Lino, et al., 2015)
<i>V. x wittrockiana</i> roja	12.4	
<i>Dahlia spp. roja</i>	7.68	(Lara-Cortés, et al., 2014)
<i>Dahlia spp. púrpura</i>	2.58	(Lara-Cortés, et al., 2014)

Ensayos cualitativos en flor de *Phaseolus coccineus*

En conjunto con la determinación cuantitativa al igual que en la testa de *Phaseolus coccineus* se desplegó un método de cromatografía de capa fina y otro para la identificación por HPLC y HPLC-MS de antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides de tal manera que se obtenga información útil para la identificación de dichos compuestos de forma cualitativa.

Cromatografía en capa fina en flor de *Phaseolus coccineus*

En esta etapa del proyecto se trabajó con la flor de *Phaseolus coccineus* para la identificación de algunos de los compuestos presentes en la misma, a fin de enriquecer la información de dicho alimento debido a que el consumo de flores se conoce desde la antigüedad en civilizaciones de todo el mundo (Pico y Nuez, 2000).

Al igual que en el ensayo de *Phaseolus* esta técnica permite hacer una evaluación sencilla, rápida y a un bajo costo, siempre y cuando el uso y manejo sea el correcto.

Los parámetros para evaluar fueron la coloración presente, así como el Rf de acuerdo con el compuesto que se analizó.

Antocianinas

Se trabajó con el extracto obtenido en la determinación cuantitativa así como los obtenidos a partir de los enriquecimientos de compuestos en amberlita, en todos los casos se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y para antocianinas se utilizó como fase móvil: Acetato de etilo: Agua: ácido fórmico en relación (75:20:10) respectivamente, el eluyente o la fase móvil fue agregada a la cámara cromatográfica, dejándola en reposo unos minutos; se colocó la placa, tomando en cuenta de que el borde inferior de la placa estuviera sumergido sin tocar las muestras colocadas, se dejó eluir hasta que estuviera a un centímetro del borde superior.

Las diferentes coloraciones que corresponden a cada una de las antocianinas descritas en la figura 14 donde el número 7 corresponde a la flor de *Phaseolus coccineus* en la que pueden observarse al menos 7 antocianinas donde existen variaciones en el color; la cianidina y malvidina presentan una coloración entre rosa y morada, en cambio la pelargonidina una color roja-naranja y finalmente la delfinidina una coloración azul, dados los colores presentes en las muestras

podemos decir que hay presencia de uno o más de los compuestos antes mencionados.

La coloración que presenta cada una de las antocianinas no proporciona información sobre la sustitución de la antocianidina, por ello es importante que se determine a que Rf corresponde cada una y comparar con muestras conocidas o bien clasificarla de acuerdo con este valor. El Rf calculado de cada una de las muestras se reporta en la tabla 24.

Tabla 23. Rf calculado en extractos de antocianinas analizadas.

Antocianina	Fuente	Rf
Delfinidina 3-glucósido	Berenjena	0.54
Cianidina 3-glucósido	Vaina China	0.68
Malvidina 3 -glucósido y derivado	Extracto purificado	0.68 0.51
Pelargonidina 3 -glucósido y derivado	Fresa	0.76
Flor de <i>Phaseolus coccineus</i>	Flor	0.76
		0.68
		0.65
		0.62
		0.58
		0.54
		0.51

Los resultados obtenidos a partir del cálculo de Rf's muestran el orden de elución de cada una de las muestras, con estos valores podemos empezar a hacer una comparación directa sumando a ello las coloraciones a fin de determinar de manera cualitativa de que compuesto se trata, por lo tanto, se observa que los Rf's que coinciden entre si son más de uno sin embargo es importante tomar en cuenta la coloración en la CCF para determinar si se trata del mismo compuesto fenólico.

Los Rf's que comparados con el color son el mismo compuesto es la Pelargonidina 3 -glucósido con 0.76.

**Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a masas:
antocianinas en flor de *Phaseolus coccineus*.**

A fin de comparar los resultados obtenidos anteriormente se utiliza este método para la identificación de antocianinas, partiendo de los extractos enriquecidos de antocianinas de las diferentes muestras.

En la tabla 25 se muestra el patrón de fragmentación de acuerdo con su antocianina correspondiente, la información obtenida en CCF y HPLC se complementan a fin de establecer el perfil en compuestos bioactivos (antocianinas).

Tabla 24. Antocianinas en flor de *Phaseolus coccineus* y su patrón LC-MS.

Antocianina	[M+H] ⁺	Fragmento
Delfinidina 3-glucósido	465	303
Cianidina 3-glucósido	449	287
Pelargonidina 3-glucósido	433	271
Cianidina 3,5-diglucósido	611	287
Pelargonidina 3-5- diglucósido	595	271
Delfinidina 3-5- diglucósido	627	303

Resultados generales en la determinación de antocianinas por CCF y HPLC-MS en flor de *Phaseolus coccineus*.

Las determinaciones que se realizaron anteriormente para cada una de las muestras por CCF y HPLC-MS se reportan en la tabla 26.

Tabla 25. Resultados generales en la cuantificación de análisis en CCF por Rf's, coloraciones, en flor de *Phaseolus coccineus*, así como otras muestras con antocianinas ya identificadas y la identificación por HPLC-MS en flor de *Phaseolus coccineus*.

Antocianina	Muestras
	Flor <i>Phaseolus coccineus</i>
Delfinidina 3-glucósido	X
Cianidina 3-glucósido	X
Malvidina 3 -glucósido	
Pelargonidina 3-glucósido	X
Cianidina 3,5-diglucósido	X
Pelargonidina 3-5- diglucósido	X
Delfinidina 3-5- diglucósido	X

Identificación de ácidos fenólicos en *Phaseolus coccineus*

Para la identificación se hizo la extracción de fenoles libres y fenoles ligados de las flores de *P. coccineus* los cuales de forma cualitativa se observaron en la CCF. Los compuestos fenólicos se encuentran del 20 al 30 % en forma libre (interacción con otras moléculas por enlaces débiles como puentes de hidrogeno o interacciones hidrofóbicas), y del 70 al 90 % se encuentran en forma ligada (unidos a celulosa, hemicelulosa, pectinas, etc.).

Al realizar la hidrólisis básica con los extractos obtenidos se puede hacer la identificación de forma cualitativa de compuestos fenólicos.

Para la fase móvil se utiliza una mezcla de disolventes: hexano: diclorometano: acetato de etilo: ácido acético. (1:1:2:0.1) y se compararon con los estándares comerciales.

En la figura 17 se usaron estándares de ácidos fenólicos y se compararon con las muestras de interés; los compuestos que se encontraron presentes en la flor de *Phaseolus coccineus* por CCF son: ácido procatecuico (Rf 0.66) , ácido p-hidroxibenzoico (Rf 0.92), ácido ferúlico (Rf 0.80), ácido p-cumárico (Rf 0.90) la coloración es un indicativo sobre si son el mismo compuesto y esto a su vez se puede comparar con los Rf's correspondientes a cada muestra; sin embargo, en la placa se observa que están presentes otros compuestos fenólicos.

Ensayos cualitativos: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): ácidos fenólicos en flor de *Phaseolus coccineus*

A fin de comparar los resultados obtenidos anteriormente se utiliza este método para la identificación de ácidos fenólicos, partiendo de los extractos obtenidos a partir de la extracción de compuestos libres y ligados en la flor de *Phaseolus coccineus*.

Identificación parcial de compuestos fenólicos presentes en flor de *Phaseolus coccineus*.

Para su identificación, la muestra se disolvió en metanol (MeOH) grado HPLC y se inyectó en el equipo de HPLC a una lectura de 325nm.

Los resultados obtenidos para cada una de las muestras y extractos utilizados se muestran en la tabla 27 a partir de la cual se hizo la comparación con estándares comerciales de los compuestos de interés.

Tabla 26. Tiempo de retención de ácidos fenólicos por HPLC en *Phaseolus coccineus*.

Ácidos fenólicos	tr (min)
Ácido p-hidroxibenzoico	8.8
Ácido protocatecuico	5.7
Ácido ferúlico	15.9

Los compuestos que se encontraron presentes en la flor de ayocote fueron ácido ferúlico y el ácido 3-4-dihidroxibenzoico principalmente, así como el ácido p-hidroxibenzoico; dichos compuestos no son los únicos presentes en la muestra sin embargo si se consideran parte de uno de los compuestos principales.

CONCLUSIONES

Se obtuvo el proceso de extracción óptimo para la obtención de compuestos bioactivos fenólicos, manteniendo su estabilidad y su reproducibilidad en la medición espectrofotométrica.

Para la extracción de compuestos fenólicos: fue una relación de disolvente (metanol:agua:ácido (80:20:1) y soluto: disolvente (1:20); el método de extracción a utilizar sonicación durante 30 min.

Se cuantificaron fenoles, flavonoides y antocianinas totales y se estableció un perfil en *Phaseolus coccineus* y su flor, los resultados indicaron que son fuentes importantes de compuestos bioactivos fenólicos.

Adicionalmente se identificaron algunos de los compuestos mayoritarios presentes en *Phaseolus coccineus* y su flor.

Determinación cualitativa de ácidos hidroxicinámicos y confirmación por HPLC, bajo tiempos de retención.

Se realizó la cuantificación de un compuesto presente en *Phaseolus coccineus*.

ANEXO 1

En conjunto con las determinaciones cualitativas, se realizaron enriquecimientos para poder identificar algunos de los compuestos presentes en las muestras de *Phaseolus coccineus* y su flor.

Cromatografía en columna preparativa.

Del extracto purificado de la flor de ayocote, se pesaron 100 mg con 20 g de gel sílice. Se empacó la columna se utilizó como disolvente la mezcla de acetato de etilo:metanol:cloroformo:ácido fórmico (40:30:20:10). Se obtuvieron las fracciones y se concentraron en el rotavapor, se realizó CCF. La relación mL eluidos/ tiempo fue 1 mL por cada 2 minutos conectado al vacío.



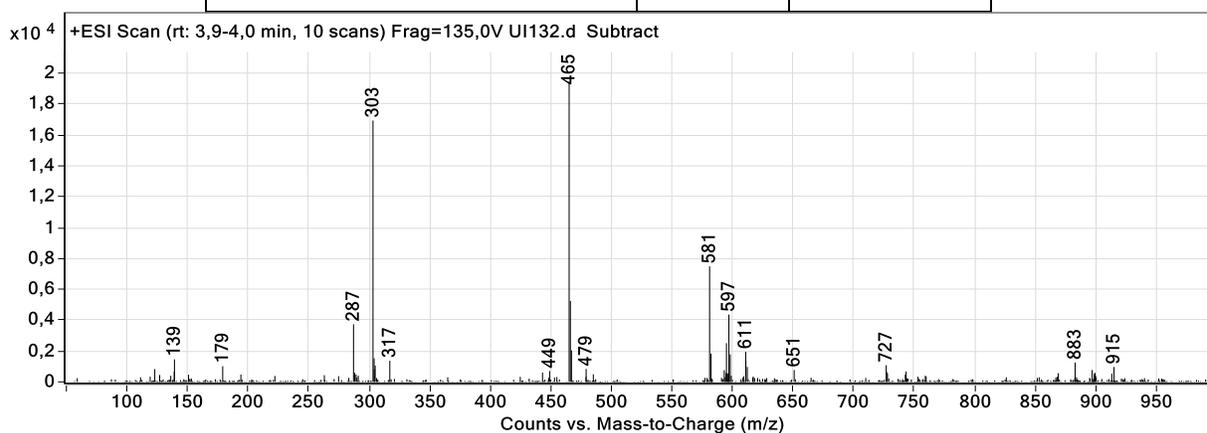
Figura 19. Cromatografía en columna para antocianinas. (Barrientos C. 2018).

ANEXO 2

Perfil de compuestos fenólicos (Antocianinas en *Phaseolus coccineus* y su flor).

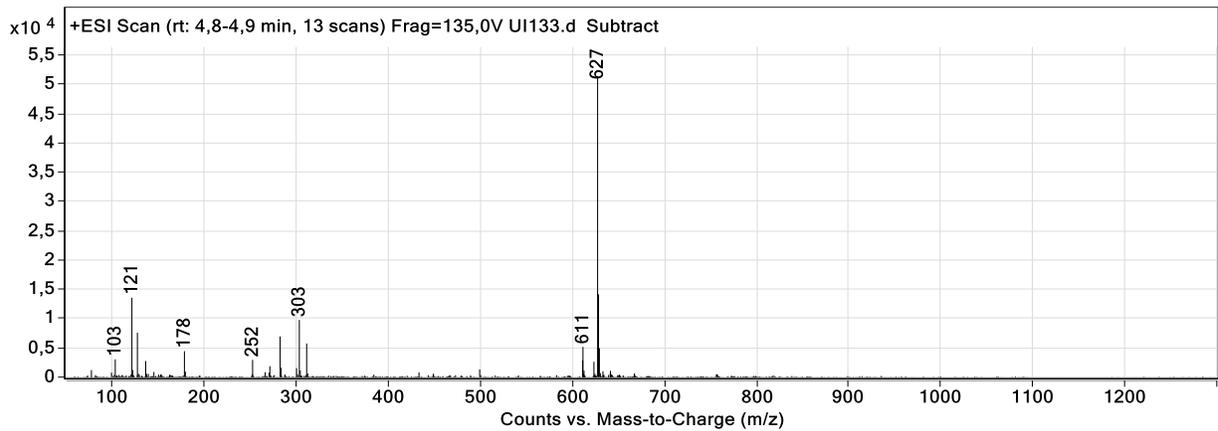
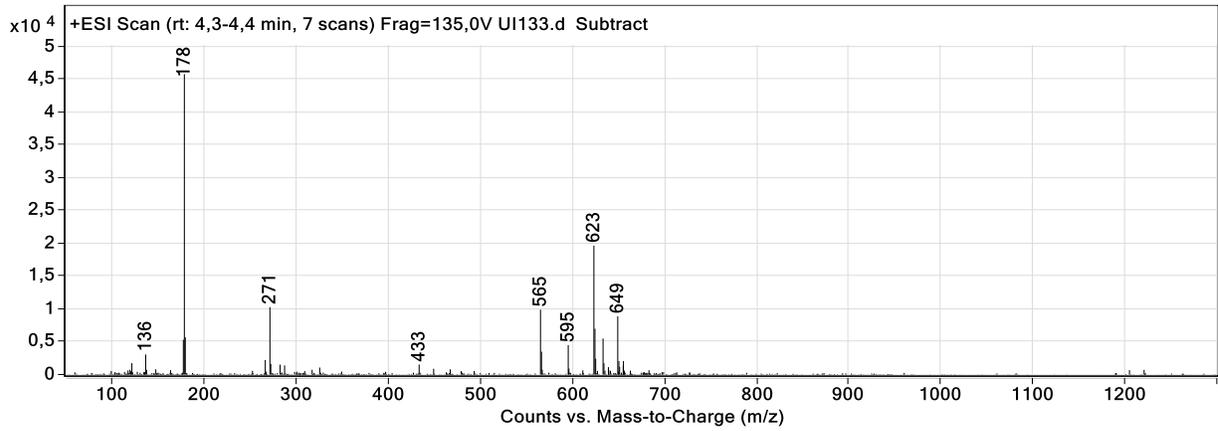
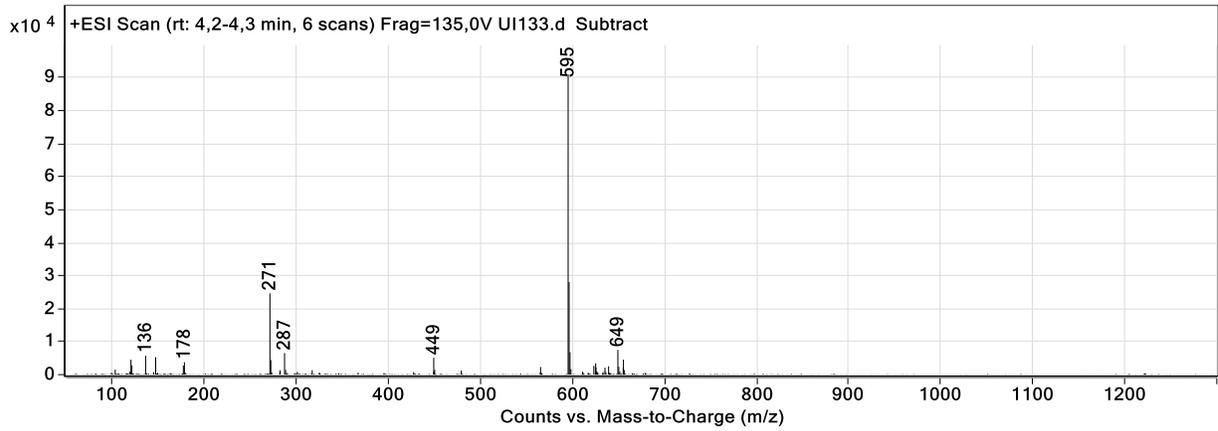
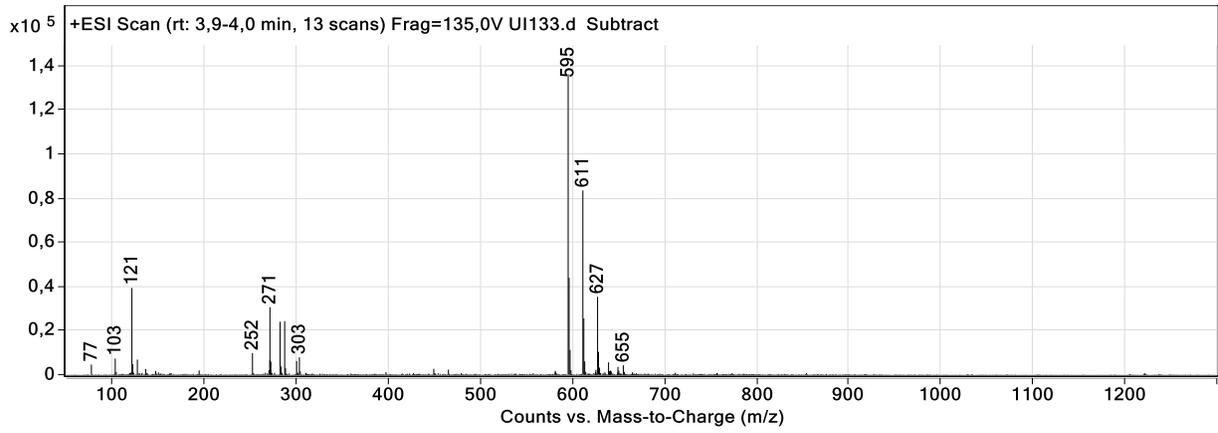
Antocianinas en *Phaseolus coccineus* y su patrón LC-MS.

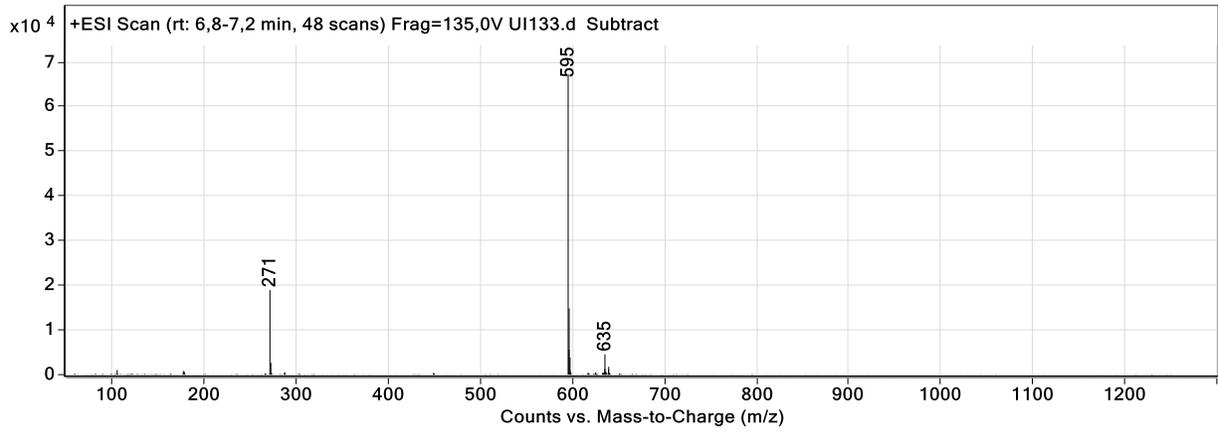
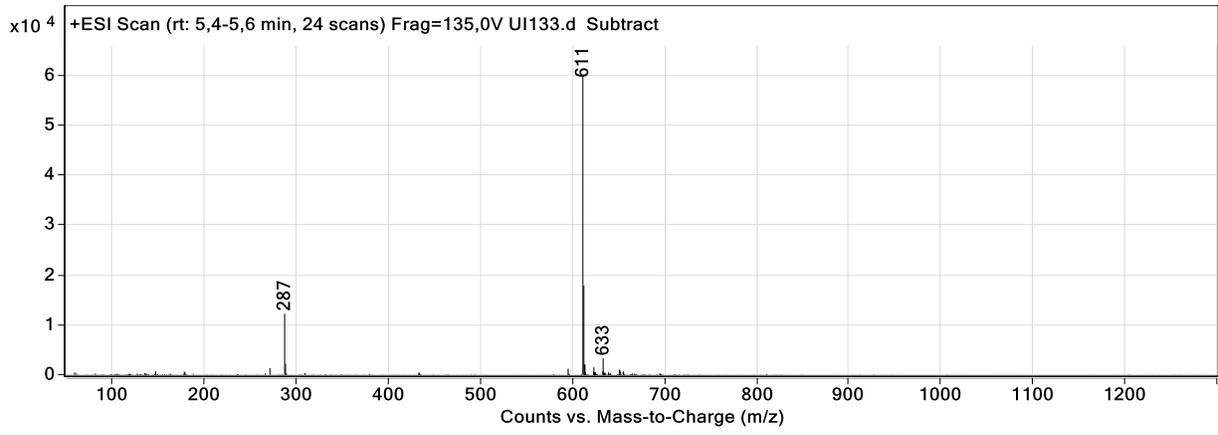
Antocianina	[M+H] ⁺	Fragmento
Delfinidina 3-glucósido	465	303
Cianidina 3-glucósido	449	287
Petunidina 3-glucósido	479	317
Cianidina 3,5-diglucósido	611	287



Antocianinas en flor de *Phaseolus coccineus* y su patrón LC-MS.

Antocianina	[M+H] ⁺	Fragmento
Delfinidina 3-glucósido	465	303
Cianidina 3-glucósido	449	287
Pelargonidina 3-glucósido	433	271
Cianidina 3,5-diglucósido	611	287
Pelargonidina 3-5- diglucósido	595	271
Delfinidina 3-5- diglucósido	627	303





BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Acosta-Santoyo, G. y otros, s.f. Efecto de una lectina de ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) sobre la sobrevivencia y proliferación de células transformadas.. *Laboratorio de Biología Celular y Molecular*.
- ❖ Arellano Lino, K. y otros, 2015. Evaluación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de tres colores de pétalos de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(4).
- ❖ Ayala Garay, O. J. y otros, 2006. YIELD AND SEED QUALITY OF AYOCOTE BEAN AT THE VALLEY OF MEXICO. *Agricultura Técnica en México*, 32(3), pp. 313-321.
- ❖ Badui Dergal, S., 2006. *Química de los alimentos*. 4 ed. México: Pearson.
- ❖ Basurto, F., Martínez, D., Castellanos, A. & Martínez A., M. A., 1996. Ciclo agrícola y fenología de *Phaseolus coccineus* L. en sistemas de agricultura tradicional en la Sierra Norte de Puebla. México.. *Etnoecológica* 3, pp. 71-81.
- ❖ Birt , D., Hendrich, S. & Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention. Flavonoids and isoflavonoids.. *Pharmacol Ther* , Volumen 90, pp. 157-177.
- ❖ Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. & Oomah, B. D., 2002. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*., 50(24), pp. 6975-80..
- ❖ Cartaya, O. & Reynaldo, I., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), pp. 5-14.

- ❖ Castañeda-Sánchez, A. & Guerrero-Beltrán, J., 2015. Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. En: *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Puebla, México: s.n., pp. 25-33.
- ❖ Chávez-Mendoza, C. & Sánchez, E., 2017. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules*, 17 Agosto, 8(22), p. 1360.
- ❖ Creus, E. G., 2004. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, Junio, 23(6), pp. 80-84.
- ❖ Damoradan, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R., 2010. *Química de los alimentos*. 3 ed. s.l.:ACRIBIA S.A..
- ❖ Debouck, D. G., 1984. *Morfología de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- ❖ Delgado Salinas, A. y otros, 2012. *El Frijol: Un regalo de México al mundo*. México: Fundación HERDEZ.
- ❖ Dziejczak, S. Z. & Hudson , B. J., 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils.. *Food Chemistry*, 14(1), pp. 45-51.
- ❖ FIRA, 2016. *Panorama Agroalimentario*. [En línea]
Available at:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf
- ❖ Garzón, G. A., 2008. Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds.. 13(3), pp. 27-36.
- ❖ Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. & Palazón, J., 2013. Phenolic Acids. En: *Natural Products*. s.l.:s.n., pp. 1951-1973.

- ❖ Guajardo-Flores, D. y otros, 2012. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans.. *Food Chemistry*, 134(4), pp. 1312-9.
- ❖ Hou, D.-X.y otros, 2004. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms.. *Carcinogenesis*, 25(1), pp. 29-36.
- ❖ Huber, K., Brigide, P., Bolis Bretas, E. & Canniatti-Brazaca, S. G., 2016. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common BrownBeans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking.. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6(5).
- ❖ Inforural, 2012. *Inforural*. [En línea]
Available at: <https://www.inforural.com.mx/frijol-siembra-y-cosecha/>
[Último acceso: 05 Mayo 2018].
- ❖ Kaplan, L., Lynch, T. F. & Smith Jr, C., 1973. Early Cultivated Beans (*Phaseolus vulgaris*) from an Intermontane Peruvian Valley. *Science*, 179(4068), pp. 76-77.
- ❖ Lara-Cortés, E. y otros, 2014. Antioxidant activity, nutrimental composition and fuctional of edible flowers of dalia. *Chapingo. Serie Horticultura*, 20(1), pp. 101-116.
- ❖ Martínez-Valverde Isabel, Periago, M. J. & Ros, G., 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 50(1), pp. 5-18.
- ❖ Mazur, W. & Adlercreutz, H., 1999. Dietary intakes and levels in body fluids of lignans and isoflavonoids in various populations. En: Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease.. *The Royal Society of Chemistry*, pp. 356-368.
- ❖ Peñarrieta, J. M. y otros, 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), pp. 68-81.

- ❖ Perera, M. B., 1997. Frijol. *Claridades Agropecuarias*, Abril, Volumen 44, p. 44.
- ❖ Petroni, A. y otros, 1993. A Phenolic Antioxidant Extracted from Olive Oil Inhibits Platelet Aggregation and Arachidonic Acid Metabolism in vitro. *Fatty Acids And Lipids: Biological Aspects. World Review of Nutrition and Dietetics*, Volumen 75, pp. 169-172.
- ❖ Ramirez-Tortosa, C. y otros, 2001. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9), pp. 1033-1037.
- ❖ Raúl, G. E., 2016. *Proyección Económica*. [En línea] Available at: <https://proyeccioneconomica.com/salud/frijol-ayocote-alimento-saludable-de-la-semana/> [Último acceso: 2019].
- ❖ Reyes Rivas, E., Padilla Bernal, L. E., Péres Veyna, O. & López Jáquez, P., 2008. History, nature and bean's nutritious quality.. *Investigación Científica*, 4(3), p. 21.
- ❖ Rocha, 2012. *Calameo*. [En línea] Available at: <https://www.calameo.com/accounts/1752202> [Último acceso: 2019].
- ❖ Rural, F., 2011. *Monografía del frijol*. México: s.n.
- ❖ Rzedowski , G. C. d. & Rzedowski, J., 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. En: *Instituto de Ecología A.C. y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. 2 ed. Pátzcuaro, Michoacán: s.n., p. 1406.
- ❖ Saburido Álvarez, M. d. I. S. & Herrera Estrella, A., 2015. "El frijol en la Era Genómica". *Revista Digital Universitaria*, 1 Febrero.16(2).

- ❖ Saburido Álvarez, M. d. I. S. & Herrera Estrella, A., 2015. El frijol en la Era Genómica.. *Revista Digital Universitaria*, 16(2).
- ❖ Salinas, M., Soria, R. J. & Espinosa, T. E., 2010. Aprovechamiento y distribución de frijol negro en el Estado de México. *SIAP, SAGARPA*, p. 20.
- ❖ SIAP, 2016. *Atlas Agroalimentario*. 1 ed. México: s.n.
- ❖ Soriano Sancho, R. A., Pavan, V. & Pastore, G. M., 2015. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76(1), pp. 74-78.
- ❖ Stintzing, F. y otros, 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments.. *J Agric Food Chem.*, 50(21), pp. 172-181.
- ❖ Strack D, 1997. *Phenolic metabolism in: Dey PM, Harbone JB (eds) Plant Biochemistry*. Londres: Academic.
- ❖ Sutivisedsak, N. y otros, 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research International*, 43(2), pp. 516-519.
- ❖ Torres Alcalá, A. & Navarro Ocaña, A., 2016. *Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos de ipomoea batatas (l.) lam variedad morada y en un snack de camote*. CDMX: TESIUNAM.
- ❖ Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C. & Ulloa Rangel, B. E., 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional. *Fuente*, Issue 8, pp. 5-9.
- ❖ Urías-Orona, V., Basilio Heredia, J., Muy-Rangel, D. & Niño-Medina, G., 2016. Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y

salvado de trigo.. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(7), pp. 43-50.

- ❖ Vargas Vázquez, M. L. P. y otros, 2014. Characterization of the runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) of the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and Sierra Madre Oriental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(2), pp. 191-200.
- ❖ Vargas-Vázquez, P. y otros, 2011. Morphologic diversity of ayocote beans from Huasteco Karst of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3), pp. 767-775.
- ❖ Vela, E., 2010. La calabaza, el tomate y el frijol. *Arqueología Mexicana*, Issue 36, pp. 64-90.
- ❖ Yoshida, K. y otros, 1996. Structural Analysis and Measurements of Antocyanos from Coloured seed coats of vignia, *Phaseolus* and *Glycine* Legumes,. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(4), pp. 589-593.