



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* EN FRIJOL CRIOLLO Y COMERCIAL
BAJO DIFERENTES MÉTODOS DE COCCIÓN**

TESIS

Que presenta:

I.B.Q. Marysol Rubio Landa

Como requisito para obtener el título de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Asesor de tesis:

D.C. Josué Altamirano Hernández

Morelia, Michoacán, febrero de 2017.

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

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
1. RESUMEN	8
1.1 ABSTRACT	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. ANTECEDENTES	11
3.1 Generalidades del frijol	11
3.2 Domesticación del frijol	12
3.3 Composición química del frijol	13
3.4 Consumo del frijol	14
3.4.1. Cocción del frijol	16
3.5 Frijol como alimento funcional	19
3.6 Compuestos fenólicos en frijol	21
3.7 Estrés oxidativo y actividad antioxidante	23
3.7.1 Actividad antioxidante de frijol	24
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
6.1 Objetivo general	29
6.2 Objetivos particulares	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Material biológico	30
7.2 Cocción	31
7.2.1 Remojo	31
7.2.2 Cocción en olla de barro (Método tradicional)	31
7.2.3 Cocción en olla de presión (Método moderno)	31
7.2.4 Freído	31
7.3 Extracción metanólica	32

7.3.1 Semilla cruda	32
7.3.2 Semilla cocida y frita	32
7.4 Cuantificación de compuestos fenólicos	32
7.5 Determinación de la actividad antioxidante	32
7.5.1 Actividad antioxidante in vitro	32
7.5.2 Actividad antioxidante in vivo	34
7.6 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por HPLC	36
7.7 Análisis estadístico	37
8. RESULTADOS	37
8.1 Cocción	37
8.2 Contenido de compuestos fenólicos	38
8.3 Actividad antioxidante	40
8.3.1 Actividad antioxidante in vitro	40
8.3.2 Actividad antioxidante in vivo	46
8.4 Análisis de componentes principales	53
8.5 Determinación del perfil de compuestos por HPLC	56
9. DISCUSIÓN	60
10. Addendum	67
10.1 Actividad antimicrobiana de frijol	67
10.2 Metodología	68
10.3 Resultados y discusión	68
10.4 Conclusión de Addendum	75
11. CONCLUSIÓN	75
12. PERSPECTIVAS	75
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
14. ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Taxonomía del género <i>Phaseolus</i>	11
Tabla 2. Contenido nutrimental de frijol.	15
Tabla 3. Preferencia en el consumo de frijol en México	16
Tabla 4. Contenido de ácidos fenólicos en frijol negro	17
Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos de frijol silvestre y comercial de color negro y pinto	18
Tabla 6. Contenido de ácidos fenólicos de frijol FT Nobre y Jalo Precoce a diferentes temperaturas de cocción	18
Tabla 7. Papel tradicional y funcional de frijol.	20
Tabla 8. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante <i>in vitro</i> de frijol FT Nobre y Jalo Precoce sometidos a diferentes métodos de cocción	25
Tabla 9. Concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de frijol Pinto Durango y Negro 8025	26
Tabla 10. Bloques y grupos de ratas Winstar con dieta adicional con harina de frijol cocido	27
Tabla 11. Clasificación de cultivares y especies utilizadas	30
Tabla 12. Actividad antioxidante <i>in vivo</i> de frijol según su color y cocción	49
Tabla 13. Actividad antioxidante <i>in vivo</i> de frijol según su color y cocción	50
Tabla 14. Comparación de perfiles de compuestos de frijol Escumite y Pinto.....	59
Tabla 16. Actividad antimicrobiana de frijol crudo	69
ANEXO E	
Tabla E 1. Tiempo de retención de estándares	86
Tabla E 2. Perfil de compuestos del extracto metanólico de Alubia blanca	89
Tabla E 3. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Negro Jamapa.....	93
Tabla E 4. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Escumite	97
Tabla E 5. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Pinto	101

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de fenoles simples y flavonoides presentes en frijol	22
Figura 2. Nivel de glucosa en ratas Wistar diabéticas alimentadas sometidas a una dieta adicionada con harina de frijol.....	28
Figura 3. Semillas de frijol utilizadas según su color y tipo de semilla	31
Figura 4. Ciclo de vida del nemátodo <i>C. elegans</i>	34
Figura 5. Ensayo de tiempo de vida en <i>C. elegans</i>	36
Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos en diferentes semillas de frijol crudas y cocidas.....	39
Figura 7. Contenido de compuestos fenólicos en frijol criollo y comercial.....	39
Figura 8. Contenido de compuestos fenólicos en frijol según el color de la semilla	40
Figura 9. Contenido de compuestos fenólicos en frijol según el método de cocción	40
Figura 10. Actividad antioxidante de frijol por la técnica de DPPH.	43
Figura 11. Actividad antioxidante de frijol por la técnica FRAP.	44
Figura 12. Actividad antioxidante de frijol por la técnica de ABTS.....	45
Figura 13. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extracto normalizado de frijol criollo y comercial.....	45
Figura 14. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extracto normalizado de frijol según su color	46
Figura 15. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extracto normalizado de frijol según el método de cocción	46
Figura 16. CL ₅₀ de H ₂ O ₂ en <i>C. elegans</i>	47
Figura 17. TL ₅₀ en <i>C. elegans</i> a una concentración de 5 mM de H ₂ O ₂	47
Figura 18. Concentraciones de compuestos fenólicos en <i>C. elegans</i>	48
Figura 19. TL ₅₀ en <i>C. elegans</i> a una concentración de 50 µg/mL de compuestos fenólicos	48
Figura 20. CL ₅₀ de frijol Negro Jamapa y Rojo a una concentración de 25 µg/mL	51
Figura 21. CL ₅₀ de frijol Pinto y Escumite a una concentración de 50 µg/mL de compuestos fenólicos	51
Figura 22. Curva concentración-respuesta con glucosa en <i>C. elegans</i>	52
Figura 23. Supervivencia de <i>C. elegans</i> con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos en medio con glucosa	52
Figura 24. Supervivencia de <i>C. elegans</i> en estrés oxidativo causado por altas concentraciones de glucosa con extracto de frijol Escumite.....	53
Figura 25. Análisis general de componentes principales	55
Figura 26. Análisis de componentes principales de frijol crudo y cocido	56
Figura 27. Estructura de una antocianina.....	64
Figura 28. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol criollas y comerciales	74
Figura 29. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol según su color	74
Figura 30. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol según el método de cocción ..	75
Figura A 1. Estructura general de un flavonoide	83

Figura B 1. Curva de calibración para cuantificación del contenido de compuestos fenólicos	83
Figura C 1. Curva de calibración de ensayo DPPH.....	84
Figura C 2. Curva de calibración de ensayo ABTS	84
Figura C 3. Curva de calibración de ensayo FRAP	85
Figura E 1. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de Alubia blanca	86
Figura E 2. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia Blanca cocida en olla express.....	87
Figura E 3. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla express y frita.....	87
Figura E 4. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla de barro.....	88
Figura E 5. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla de barro y frita.....	88
Figura E 6. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Negro Jamapa	90
Figura E 7. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla express	90
Figura E 8. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla express y frito	91
Figura E 9. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla de barro	91
Figura E 10. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla de barro y frito	92
Figura E 11. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Escumite ..	94
Figura E 12. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla express	94
Figura E 13. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla express y frito	95
Figura E 14. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla de barro.....	95
Figura E 15. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla de barro y frito.....	96
Figura E 16. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Pinto	98
Figura E 17. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla express	98
Figura E 18. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla express y frito	99
Figura E 19. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla de barro	99
Figura E 20. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla de barro y frito	100

1. RESUMEN

Estudios recientes demuestran que el consumo de frijol previene enfermedades crónico-degenerativas como diabetes y cáncer por lo cual se le considera un alimento funcional. Entre los diferentes metabolitos que contiene la semilla de frijol los reportados como responsables de la prevención de estas enfermedades son los compuestos fenólicos por su capacidad antioxidante y antiproliferativa. Además, se ha reportado que el contenido de compuesto fenólicos es mayor en semillas de coloración oscura con respecto a las claras o pintas y que éste contenido disminuye después de la cocción de esta leguminosa.

Dadas las diferencias en el contenido de estos metabolitos secundarios dependiendo el cultivar y especie de frijol, se realizó este estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto de diferentes métodos de cocción utilizados comúnmente sobre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* en diferentes semillas de frijol criollo y comercial. Se utilizaron 4 semillas comerciales (Peruano, Pinto, Rojo y Negro Jamapa) y 4 semillas criollas (Alubia blanca, Escumite, Rojo sangre de toro y Negro de vara) sometidas al método de cocción tradicional y método de cocción a presión, así como un freído posterior a la cocción para ver los cambios en el perfil de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Para esto, se realizaron extracciones metanólicas de las semillas tanto crudas como cocidas y se determinó el contenido de compuestos fenólicos con el método de Folin-Ciocalteu, donde se encontró para la semilla cruda un intervalo de 1.10 mg en Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g para el frijol Escumite hasta 3.77 mgEAG/g para el frijol Pinto. Después de una cocción se tuvo un intervalo de 0.29 mgEAG/g para la Alubia blanca hasta 1.44 mgEAG/g para el frijol Negro de vara; y un intervalo de 0.14 mgEAG/g para el frijol Peruano hasta 1.6 mgEAG/g para el frijol Rojo sangre de toro después de ser fritos.

La actividad antioxidante *in vitro* se evaluó con los extractos metanólicos normalizados a 10 µg/ mL de compuestos fenólicos por las técnicas de DPPH[·], ABTS^{·+} y FRAP. Se obtuvo el mejor resultado en semilla cruda de frijol Escumite (FRAP) y Rojo (ABTS^{·+} y DPPH[·]). En semilla cocida la mejor actividad se vio con los frijoles Escumite, Rojo y Alubia blanca, mientras que en semilla frita destacaron los frijoles Pinto y Alubia blanca. Para ver la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó al nemátodo *Caenorhabditis elegans* sometido a dos tipos de estrés oxidativo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y altas concentraciones de glucosa. El mejor resultado se obtuvo con el extracto de frijol Escumite crudo a una concentración de 50 µg/ mL de compuestos fenólicos con H₂O₂ y con 25 µg/ mL en la prueba con glucosa.

El perfil de compuestos fenólicos de frijol con actividad contrastante se determinó por medio de HPLC donde se encontraron en todos los extractos analizados los ácidos Quínico, p-Cumárico y Ferúlico, además de dos compuestos no identificados en tiempos de retención de 5.3 y 8.7 minutos.

DPPH[·]: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

ABTS^{·+}: Ácido 2-2'-Azino-bis 3-etilenbenzotiazonilo-6 sulfónico

FRAP: Poder Antioxidante Reductor de Hierro

HPLC: Cromatografía Líquida de alta resolución

1.1 ABSTRACT

Recent studies show that bean consumption prevents chronic degenerative diseases such as diabetes and cancer whereby is considered a functional food. Among the various metabolites contained in the bean seed, those reported as responsible for the prevention of these diseases are the phenolic compounds for their antioxidant and antiproliferative capacity. In addition, it has been reported that the content of phenolic compounds is higher in dark colored seeds respect to pints or white seeds and this content decreases after cooking this leguminous.

Given that differences in content of secondary metabolites depends on cultivar and species of bean, the aim of this study was to determine the effect of cooking method on the phenolic content and the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* in landraces and commercial bean seeds. Four commercial seeds (Peruano, Pinto, Rojo y Negro Jamapa) and four landraces seeds (Alubia blanca, Escumite, Rojo sangre de toro y Negro de vara) that were subjected to the traditional cooking method, pressure cooking method and fried to evaluate changes in the profile of phenolic compounds and antioxidant activity. For this methanolic extraction of seeds raw and cooked were made and phenolic compounds content was determined with the Folin-Ciocalteu method, finding for raw seed an interval of 1.10 mgGAE/g for Escumite bean to 3.77 mgGAE/g for Pinto beans. After cooking a range of 0.29 mgGAE/g for Alubia blanca to 1.44 mgGAE/g for the Negro de vara bean was recorded; and a range of 0.14 mgGAE/g for Peruano bean to 1.6 mgGAE/g for Rojo sangre de toro after being fried.

The antioxidant activity *in vitro* was evaluated whit normalized extracts to 10 µg/mL of phenolic compounds by DPPH, ABTS^{•+} and FRAP techniques. The best result was obtained with raw seed of Escumite and Rojo beans. In cooked seed the best activity was obtained with Escumite, Rojo and Alubia blanca seeds, while in fried seed the best result was obtained with Pinto and Alubia blanca beans. The nematode *Caenorhabditis elegans* was used to evaluate the antioxidant activity *in vivo* using two types of oxidative stress, hydrogen peroxide (H₂O₂) and high concentration of glucose. The best result was obtained with Escumite bean observed at a concentration of 50 µg/mL of phenolic compounds with H₂O₂ and 25 µg/mL in the test with glucose.

The profile of phenolic compounds in bean with different activity was determined by HPLC and found in all extracts analyzed Quinic, p-Coumaric and Ferulic acids and two unidentified compounds in retention times of 5.3 and 8.7 minutes.

2. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una fuente rica en nutrientes por su contenido considerable de proteínas, calorías, ácidos grasos insaturados (como el ácido linoleico) fibra soluble e insoluble, vitaminas y minerales. En América latina y en especial en México el frijol es un producto con mucha importancia socioeconómica tanto por la superficie de siembra como por la cantidad de consumo *per capita*, formando parte de la dieta básica en todos los niveles socioeconómicos (Ramírez y col., 2008).

Además del contenido nutrimental al frijol se le han atribuido propiedades quimioprotectoras ya que contiene compuestos como oligosacáridos y fenoles (taninos condensados y flavonoides), inhibidores de tripsina, lectinas entre otros. A estos compuestos se les han demostrado propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas al ser ingeridos en la dieta. (Guzmán y col., 2002; Ulloa y col., 2011).

Se ha informado que existe una relación directa entre el consumo de frijol y una menor incidencia de cáncer de colon, este efecto se le atribuye en parte a la disminución de radicales libres (Reynoso y col., 2007). Sin embargo, se ha descuidado el estudio y conservación de las formas silvestres y criollas de esta leguminosa, perdiendo su biodiversidad en forma irreversible, además de un abandono en el consumo de alimentos naturales y formas de cocción tradicionales, observándose en la actualidad un incrementado en el consumo de productos procesados y listos para comer dentro del denominado “estilo de vida moderno” (Espinosa, 2004).

Ante esta situación se han estudiado los posibles efectos nutracéuticos de diversos alimentos consumidos diariamente como fuente de compuestos antioxidantes para prevenir enfermedades relacionadas con un estrés oxidativo. Los reportes de los efectos benéficos del frijol se han realizado en animales de laboratorio, a los cuales se les alimenta con harina de frijol crudo y son escasos los estudios acerca del efecto que tiene la cocción tradicional en los compuestos responsables del efecto preventivo reportado (Reynoso y col., 2007; Díaz y col., 2006; Hangen y Bennink, 2002).

Dado el gran consumo de esta leguminosa en México, su gran aporte nutrimental y los antecedentes como alimento funcional se deben investigar variedades criollas de frijol consumidas en México, así como saber de qué manera afectan diferentes formas de cocción la actividad biológica de los compuestos fenólicos presentes en la semilla, con ensayos de actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* para crear información científica de que frijol puede reducir problemas asociados al estrés oxidativo y cuál es el mejor método de cocción para conservar dicha actividad antioxidante.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del frijol

Se conoce como frijol (*Phaseolus* sp) a la semilla madura (lista para germinar) de la planta perteneciente a la clase de las dicotiledóneas, del orden de las Fabales y de la familia Leguminosae (Tabla 1) cuyo fruto se caracteriza por crecer dentro de una vaina. Estudios basados en datos morfológicos, clasificación taxonómica y análisis genéticos de DNA de cloroplasto sugieren que el género *Phaseolus* es originario de América Latina y que posee alrededor de 55 especies silvestres que han sido encontradas desde el Suroeste de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Delgado y col., 1991; Espinosa, 2006). El frijol empezó a cultivarse hace aproximadamente 7000 años A.C. en Perú, Guatemala y México.

Tabla 1. Taxonomía del género *Phaseolus*.

Clasificación taxonómica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Leguminosae
Tribu:	Phaseoleae
Género:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>Phaseolus</i> sp

(Tomado de Linnaeus, 1753)

Una especie se define como el conjunto de organismos o poblaciones naturales capaces de entrecruzarse y producir descendencia fértil. En el mundo se conocen alrededor de 150 especies de frijol, de las cuales aproximadamente 50 se encuentran en México con gran variedad de tamaños, colores y requerimientos ecológicos (Hernández y col., 2013). Se considera que la especiación del género se efectuó en los neotrópicos y fue favorecida por el conjunto de características geográficas, climáticas y ecológicas, así como del área de transición entre climas templados y de alta elevación, desiertos y trópicos secos (Espinosa, 2006).

La semilla de frijol se puede clasificar de acuerdo a diversos criterios. Por su consumo como grano seco y vaina verde (ejote). Aunque a nivel práctico, se clasifica a los cultivares de frijol de acuerdo a las características de su grano, en especial en lo relativo a su tamaño y color.

La gran diversidad de climas y nichos ecológicos, así como culturales de cada país, llevó durante un gran período de la historia a que se desarrollara la gran diversidad de frijoles que existen actualmente: negros, azulados, flores, bayos, pintos, ayocotes, alubias, entre otros, lo cual constituye un mercado muy variado en cuanto a preferencias y precios (Reyes y col., 2008).

El tamaño se determina por el peso de 100 granos y los materiales se clasifican en tres grupos de la siguiente manera: pequeños (hasta 25 g/100 semillas), medianos (entre 25 y 40 g/100 semillas) y grandes (desde 40 g/100 semillas) (Ulloa y col., 2011).

3.2 Domesticación del frijol

El frijol silvestre tiene un crecimiento en forma de enredadera y su germinación se da en lugares comunes como los matorrales en las orillas de carreteras, orillas de bosques o de parcelas, las semillas son de colores lilas y cremas. Las poblaciones de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L.) actualmente son muy poco usadas para consumo humano ya que son muy difíciles de conseguir, su crecimiento es muy lento y no se tiene conocimiento de sus propiedades; muchas de ellas son tolerantes a ambientes inductores de estrés y sus características nutricionales y de calidad pueden ser muy buenas, por ello representan un recurso desaprovechado (Isely, 1990).

La domesticación es un proceso resultante de la combinación de la evolución natural y la selección empírica practicada por el hombre, mediante la cual se derivan los cultivos domesticados a partir de sus progenitores silvestres. En frijol la domesticación redujo la diversidad genética en comparación con su ancestro, debido al pequeño número de semillas que fueron base de las poblaciones domesticadas (Hernández y col., 2013; Ladizinsky, 1998), y la posterior selección con base en características particulares que redujeron aún más la diversidad genética de loci específicos y regiones genómicas circundantes. Un cambio importante que ocurrió con la domesticación fue un incremento en el tamaño de la semilla, reducción de la dureza y del tiempo de cocción, además de una marcada reducción en los contenidos de triptófano y proteínas. En cambio, una semilla silvestre tiene un mayor contenido de minerales y fibra dietética (Acosta y col., 2007).

Solo cinco especies de *Phaseolus* han sido domesticadas para el consumo humano *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* y *P. coccineus*. Las dos primeras han sido objeto de múltiples domesticaciones en los Andes meridionales y Centroamérica; la tercera, y la menos influenciada por la domesticación, se halla en México, Mesoamérica, el Caribe y América del Sur (Perú); y las dos últimas corresponden a México, el sur-oeste de los Estados Unidos y Centroamérica. México es considerado como uno de los centros de origen y domesticación del género *Phaseolus*, entre ellos el que más destaca por su valor comercial es el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Hernández y col., 2013).

Dentro de las características importantes del frijol cultivado podemos mencionar que son plantas arbustivas, de estatura corta, semillas de rápida maduración, la vaina es ideal para abrir, es una planta de vida corta, anual y de tallos frágiles, posee pedúnculos cortos, además de una amplia variedad de colores y adaptaciones fisiológicas, aunque estas últimas son debidas a la selección hecha por el hombre (Guzmán y Paredes, 1999) y a cada una de las semillas dentro de esta diversidad se les conoce como cultivar.

Dentro del grupo de frijol cultivado se encuentra el frijol criollo y mejorado, los cuales son utilizados para el consumo humano. El frijol criollo surge de manera natural como resultado del proceso evolutivo de domesticación, no ha sido manipulado genéticamente e históricamente ha sido sembrado por los campesinos en forma local en casi todos los estados de la República, representando una amplia variedad en la morfología y color de las semillas. Por otro lado, el frijol conocido como comercial ha sido producto del mejoramiento genético a través de selecciones y cruces dirigidas por el hombre para obtener las características de su interés, ya sea conferir resistencia a ciertos patógenos, tales como virus, hongos y bacterias o incrementar el rendimiento en su producción, mayor tamaño de la semilla, mayor permeabilidad, entre otras (Acosta y col., 2000).

3.3 Composición química del frijol

El frijol es una importante fuente de proteínas, carbohidratos, vitaminas del complejo B, minerales y fibra; tienen un bajo contenido de grasa y, por ser un alimento de origen vegetal, no contienen colesterol. Dentro de sus características destaca el valor nutritivo de esta leguminosa ya que presenta de 2 a 3 veces más proteína que los cereales además de un alto contenido de minerales, especialmente Fe^{3+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} .

Dependiendo del tipo de frijol, el contenido de proteínas varía del 14 al 33%, es rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina con tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Tabla 2).

En relación a los carbohidratos, 100 g de frijol crudo aportan de 2.9 a 4.5 % de estos compuestos dependiendo del cultivar, la fracción principal de estos carbohidratos está constituida por el almidón, y cantidades significativas de mono y oligosacáridos.

El almidón representa la principal fracción de energía en esta leguminosa, a pesar de que, durante la cocción, una parte del mismo no queda disponible dado que se transforma en el denominado almidón resistente a la digestión. La fracción correspondiente a los lípidos es de 1.5 a 6.2 g/100 g de semilla, predominando los ácidos grasos mono y poliinsaturados (Reynoso y col., 2007). Sus oligosacáridos (principalmente de la familia de la Rafinosa) se absorben lentamente en el organismo a comparación de los monosacáridos presentes en la semilla por lo que ayudan a prevenir aumentos abruptos en los niveles sanguíneos de azúcar.

En cuanto a vitaminas, el frijol tiene alto contenido de tiamina, riboflavina, niacina que son necesarias para la producción de energía y contiene ácido fólico o vitamina B9 particularmente en el frijol Pinto, el frijol de Ojo Negro y las Alubias. Fisiológicamente, consumir suficiente ácido fólico permite al cuerpo desarrollar muchas de sus funciones esenciales, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos en las células, la síntesis y la reparación del ADN, la creación de glóbulos rojos, y también ayuda a prevenir la anemia y es conocido por sus aplicaciones para evitar las deformidades de los fetos, la enfermedad de Alzheimer, así como diversos tipos de cáncer (Krupa, 2008).

El frijol, como otras leguminosas, contiene además de los compuestos nutritivos, sustancias bioactivas como inhibidores de enzimas, lectinas, fitatos, oligosacáridos y taninos (Tabla 2), que también son metabolizados por el organismo y pueden tener efectos positivos a la salud (Campos y col., 2009).

3.4 Consumo del frijol

El consumo *per capita* de frijol en México reporta una tendencia a la baja durante los últimos treinta años, al pasar de 16 kilogramos por persona por año en la década de 1980 a 10 kilogramos en la actualidad. Lo anterior debido a diversos factores entre los que destacan la migración, el urbanismo, la reducción en el número de miembros en las familias, cambios en el poder adquisitivo y la incorporación de la mujer a la actividad laboral. Asimismo, se observa una sustitución del consumo de grano de frijol por frijol industrializado, debido a su fácil preparación (Panorama agroalimentario, 2015).

En cuanto a las preferencias del consumo de un cultivar en particular varía dependiendo la zona del país. Un estudio realizado en 2010 muestra que del 77.2% de los consumidores que demandan el grano de frijol el 42.9 % prefiere frijoles negros; el 35.2% prefiere semillas de color claro y el 22% prefiere frijoles pintos (Tabla 3).

Estas preferencias explican la existencia de nichos de mercado para las semillas que tienen mayor demanda. Por ejemplo, de los compradores del norte del país, más de la tercera parte demanda semillas pintas nacionales; sin embargo, la expansión de tiendas de autoservicio y la introducción de cadenas estadounidenses han favorecido la sustitución de éstas por frijoles pintos importados provenientes de Colorado, USA. En el occidente del país, las variedades claras representan un 15.9% del consumo nacional y

63.7% del consumo regional, destacando los Peruanos (higuera y bola), flor de Mayo (Mantequilla y Anita) y flor de Junio. Finalmente, en el sur 17% prefiere frijoles negros, casi una quinta parte claros y sólo 0.4% compra semillas pintas (Rodríguez y col., 2010).

Tabla 2. Contenido nutrimental de frijol.

Composición química (%)	Contenido
Proteína	14-33
Lípidos	1.5-6.2
Fibra total	14-19
Insoluble	10.1-13.4
Soluble	3.1-7.6
Carbohidratos	2.9-4.5
Calidad de la proteína	
Digestibilidad (%)	52-75
Aminoácidos esenciales (g/100g de proteína)	
Fenilalanina + tirosina	5.3-8.2
Isoleucina	2.8-5.8
Leucina	4.9-9.9
Lisina	6.4-7.6
Metionina + Cisteína	1.2-1.5
Treonina	4.4-7.0
Triptófano	---
Valina	4.5-6.7
Minerales (mg/100g)	
Calcio	9-200
Fosforo	460
Hierro	3.8-7.6
Magnesio	200
Zinc	2.2-4.4
Vitaminas (mg/ 100g)	
Tiamina (B1)	0.86-1.14
Niacina (B3)	1.16-2.68
Ácido fólico	0.17-0.58
Otros componentes	
Oligosacáridos (mg/g)	25-50
Taninos (meq.cat. /g)	9.6-131.4
Inhibidores de tripsina (UIT/mg)	13-29
Ácido Fítico (%)	0.6-2.7
Lectinas (%)	1-5

(Reynoso y col., 2007)

Tabla 3. Preferencia en el consumo de frijol en México.

Consumo de frijol en México (%)					
COLOR	REGIÓN				TOTAL NACIONAL
	Norte	Occidente	Centro	Sur	
Oscuros					
Negro Jamapa	0.23	0.53	0.45	7.60	8.8
Arrayanes	0.00	0.00	0.05	6.18	6.2
Veracruz	0.08	0.33	4.50	3.30	8.2
Ayocote y Sangre de toro	2.98	5.40	8.75	2.55	19.7
				Subtotal	42.9
Claros					
Peruano	1.63	9.23	0.98	1.18	13.0
Flor de Mayo	0.83	3.60	2.18	1.15	7.8
Flor de Junio	0.53	2.40	1.60	0.43	5.0
Bayos y Alubias	3.13	0.70	3.38	2.23	9.4
				Subtotal	35.2
Pintos					
Nacional	9.55	1.43	1.58	0.23	12.8
Importado	5.38	0.70	0.95	0.18	7.2
Ayocote y vaquita	0.70	0.70	0.60	0.00	2.0
				Subtotal	22.0

(Rodríguez y col., 2010)

3.4.1. Cocción del frijol

Para alimentación humana, las leguminosas se consumen después de procesos de cocción y en ocasiones después de freírlas, en este proceso se tiene la posibilidad de reducir componentes no deseables presentes en la semilla cruda además de eliminar agentes patógenos al organismo, mejorar su textura y palatabilidad.

En México el método tradicional de cocción consiste en dos pasos: Primero un remojo previo de la semilla en agua a temperatura ambiente una noche antes de la cocción; este proceso ablanda el grano, reduce el tiempo de cocción e inicia la degradación de oligo y polisacáridos presentes en la semilla, también aumenta las actividades de tripsina y α -amilasa como consecuencia de un aumento de la permeabilidad en la pared del grano (Abd y Habiba, 2003). Después de ese remojo, la cocción se realiza en un recipiente de barro por 2 o 3 horas aproximadamente.

En la actualidad esa práctica se ha modificado y la cocción de frijol se lleva a cabo en una olla cerrada herméticamente a presión controlada llamada "olla express", en este método moderno no se remoja previamente la semilla, tiene una temperatura mayor

(aproximadamente 120°C) y mayor presión por lo que la cocción completa se obtiene en un periodo de tiempo menor (Martínez, 2013).

Estudios muestran que la temperatura de cocción y el remojo previo influyen sobre la retención de minerales como hierro y zinc en la semilla cocida y concluyen que factores como tamaño de grano y brillo de la testa en el grano de frijol son determinantes en el tiempo de cocción (Hernández y Campos, 1993). También durante la cocción ocurren varios cambios fisicoquímicos en la fibra dietética de la pared celular que ocasionan la degradación y solubilización de polisacáridos, dichos cambios afectan la respuesta nutricional a la fibra como un compuesto hipocolesterolémico y mejoran la respuesta glucémica durante el tránsito intestinal (Hernández y Campos, 1993; Reynoso y col., 2007).

Cuando el frijol está en contacto con agua puede existir cierta lixiviación de vitaminas y minerales (especialmente de los nutrientes muy hidrosolubles). Un análisis proximal del caldo de frijol realizado en 2004 dio con resultado un contenido del 6.9% a 10.6% de carbohidratos y de un 1.2% a 2.1% de proteínas. El calor destruyó algunos compuestos termolábiles tales como inhibidores de proteasas, hemaglutininas, etc., desnaturalizó proteínas e incluso produjo un cierto grado de hidrólisis en otras moléculas, todo lo cual condujo a una predigestión proteica que podría facilitar la digestión posterior de este alimento, no obstante, un tratamiento térmico prolongado hace disminuir el valor nutritivo de la proteína, ya que destruye aminoácidos esenciales como lisina y cisteína (Serrano y Goñi, 2004).

En relación al cambio en el contenido de compuestos fenólicos después de un proceso de cocción Almanza y col. (2008) realizaron un estudio en el cual se cuantificó la cantidad de ácidos fenólicos en equivalentes de Ácido Gálico en semillas de frijol negro sometido a cocción y freído, observando una pérdida del 50% de estos compuestos en promedio en semillas cocidas y hasta un 65% en promedio para las semillas fritas. En este estudio se observaron dos casos peculiares, el frijol Negro Tacana y Negro 8025, los cuales tuvieron un mayor contenido de ácidos fenólicos en semilla frita en comparación al valor obtenido con semilla cocida (Tabla 4), los autores argumentan que esto podría ser por una polimerización de los compuestos fenólicos al momento del freído de la semilla.

Tabla 4. Contenido de ácidos fenólicos en frijol negro.

Frijol	Ácidos fenólicos (mg EAG*/100 g)		
	Crudo	Cocido	Refrito
Negro INIFAP	503.2	402.9	306.7
Negro Michigan	805.6	347.2	213.6
Negro Tacana	572.6	342.9	356.9
Negro 8025	1089.4	257.9	401.9
Negro Durango	1059.3	457.5	371.9
Negro Jamapa	672.5	351.9	310.8

* Equivalentes de Ácido Gálico
(Modificado de Almanza y col., 2008)

Díaz y col. (2006) realizaron un estudio comparativo entre variedades silvestres y cultivares comerciales de frijol mexicano. Utilizaron cultivares de coloración negra y pinta, los compuestos encontrados en estas variedades fueron los flavonoides Quercetina y Kaempferol y los ácidos p-Hidroxibenzoico, p-Cúmarico. El cultivar de color negro tuvo un mayor contenido de Quercetina, Ácido p-Cúmarico y Ferúlico que la variedad silvestre; en cuanto a las semillas pintas, la variedad silvestre tuvo mayor contenido de Quercetina y Ácido p-Cúmarico. Después de una cocción en autoclave por 20 min se redujo el contenido de Quercetina de un 49 a un 65% según la semilla de frijol, y de un 5 a un 71% el contenido de Kaempferol, observándose mayores pérdidas en los frijoles pintos (Tabla 5). Los autores llegan a la conclusión que el procesamiento térmico utilizado disminuye la cantidad de compuestos fenólicos de manera diferencial en cada cultivar, resaltando la importancia de estudiar variedades silvestres como una mejor fuente de compuestos fenólicos, los cuales tienen actividad antioxidante.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos de frijol silvestre y comercial de color negro y pinto.

Frijol	Quercetina		Kaempferol		Ácido p-Hidroxibenzoico		Ácido p-Cúmarico	
	crudo	cocido	crudo	cocido	crudo	Cocido	crudo	cocido
Negro comercial	15.5 ± 7.1	9.4 ± 2.2*	19.6 ± 0.6	15.9 ± 3.1	8.8 ± 2.8	6.4 ± 1.6	5.9 ± 0.7	4.1 ± 0.5
Negro silvestre	14.2 ± 5.3	6.5 ± 0.6*	26.5 ± 14.8	11.6 ± 2.2*	9.8 ± 2.1	7.5 ± 1.5	4.2 ± 1.5	3.0 ± 1.2
Pinto comercial	7.9 ± 0.9	5.2 ± 0.8	85.2 ± 3.18	40.7 ± 5.9*	11.3 ± 1.9	7.7 ± 0.5	4.2 ± 0.9	1.5 ± 1.7
Pinto silvestre	11.4 ± 0.1	7.1 ± 0.6*	44 ± 29.6	16.6 ± 3.2*	10.1 ± 0.8	7.5 ± 0.3	4.7 ± 1.2	2.8 ± 1.6

*Denota diferencia significativa entre frijol crudo y cocido por cada compuesto (Modificado de Díaz y col., 2006)

En el 2009, Gálvez y col. realizan un estudio sobre el contenido de ácidos fenólicos de dos cultivares de frijol típicos de Brasil, uno de color negro (FT Nobre) y otro de color pinto (Jalo Precoce) por medio de HPLC, para esto, 100 g de cada semilla fueron sometidos a diferentes temperaturas de cocción, 100°C y 121°C con y sin remojo previo de la semilla una noche antes. Los resultados mostraron que después de la cocción se pierde en promedio un 80% el contenido de ácidos fenólicos y la pérdida es mayor cuando la semilla fue remojada previamente. En el frijol negro no hubo una diferencia significativa entre temperaturas de cocción mientras que en el frijol pinto la pérdida de ácidos fenólicos fue menor a una temperatura de 121°C en comparación a aquellas semillas cocidas a 100°C (Tabla 6). Con este antecedente se observan claramente los factores que contribuyen a la pérdida de compuestos fenólicos en el frijol que son el remojo previo de la semilla y la temperatura de cocción.

Tabla 6. Contenido de ácidos fenólicos de frijol FT Nobre y Jalo Precoce a diferentes temperaturas de cocción.

Frijol	Ácidos fenólicos (mg /100 g)				
	CRUDO	S/R 100° C	S/R 121° C	C/R 100° C	C/R 121° C
FT	37 ± 4	5.0 ± 1.0 a	5.2 ± 0.3 a	1.8 ± 0.2 b	1.8 ± 0.02 b

Nobre					
Jalo Precoce	25.2 ± 0.1	7.7 ± 0.2 b	9.2 ± 0.03 a	2.1 ± 0.05 d	3.1 ± 0.1 c

S/R: Sin remojo previo, C/R: Con remojo previo, letra diferente en cada fila denota diferencia significativa

(Modificado de Gálvez y col., 2009)

3.5 Frijol como alimento funcional

En la actualidad el frijol se considera un alimento funcional por su contenido de proteína, fibra soluble y compuestos nutraceuticos como fenoles simples y antocianinas que son sustancias antioxidantes. Un alimento funcional es aquel que proporciona beneficios en la salud más allá de la nutrición básica (Goldberg, 1994). Existen dos categorías dentro de los alimentos funcionales:

1. Alimentos que naturalmente contienen un componente que ofrece beneficios adicionales al consumidor.
2. Alimentos procesados en el que el componente se añade al alimento para darle beneficios adicionales.

Entre algunos ejemplos de estos alimentos destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos benéficos.

Existe una gran variedad de alimentos de origen vegetal que contienen compuestos con actividad antioxidante, como el té verde, el vino tinto o el chocolate (Ugatongo, 2009). Entre estos componentes, destacan los compuestos fenólicos, como los flavonoides que han sido estudiados en cereales, leguminosas, frutas, hortalizas que, además, algunas investigaciones han mostrado que ejercen efectos beneficiosos sobre algunas enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hertog y col., 1993; Angel, 2005; Aparicio y col., 2008; Morón y col., 2013).

El frijol se considera un alimento funcional dentro de la categoría 1 por el contenido de varios compuestos llamados nutraceuticos como fibra soluble e insoluble, compuestos fenólicos y almidón resistente a la hidrólisis de enzimas digestivas (Vargas y col., 2003) y por su aporte nutrimental en la dieta, ya que está dentro de la pirámide de la alimentación en el mismo grupo que las nueces, carnes, pescados y aves por su contenido de proteínas y aceites (Guzmán y col., 2002).

Los flavonoides y ácidos fenólicos de la semilla de frijol tienen la propiedad de interceptar y reaccionar con agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres. Diversos estudios han evaluado el potencial de algunos flavonoides e isoflavonas para inhibir el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el de colon y mama (Reynoso y col, 2007; Hangen y Bennink, 2002).

El papel que tiene la fibra del frijol como fitoquímico es atribuida a su efecto hipocolesterolemico, es decir, disminuye hasta un 10% el colesterol en la sangre. También el almidón resistente del frijol puede ejercer el mismo efecto que la fibra. Por otra parte, la fermentación en el colon de la fibra soluble y el almidón resistente generan

ácidos grasos de cadena corta, que a su vez provocan la disminución de la síntesis hepática del colesterol (Guzmán y col., 2002).

Los inhibidores de tripsina son considerados como inhibidores proteolíticos, inhiben las carcinogénesis y pueden ser utilizados como agentes quimiprotectores, es decir, para proteger al organismo contra efectos secundarios de tratamientos de ciertas enfermedades.

Las lectinas del frijol disminuyen el crecimiento de linfomas no-Hodgking (cáncer del tejido linfoide, que abarca los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos del sistema inmunitario) (Tabla 4) (Guzmán y col., 2002).

El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de cereales y leguminosas. Sin embargo, en esta forma el P permanece no disponible para el hombre y animales mono-gástricos, debido a que éstos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasa endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato. (Martínez y col., 2002) Paradójicamente, el AF a bajas dosis presenta efectos positivos sobre la salud, como la reducción de la formación de cálculos renales y prevención de enfermedades cardiovasculares, además, disminuye la velocidad de digestión del almidón ya que puede unirse directamente a las α -amilasas inactivándolas, también, a bajas concentraciones se ha demostrado que reduce el riesgo de contraer cáncer, principalmente de colon y seno, probablemente por su poder antioxidante (Guzmán y col., 2002; Ulloa y col., 2011).

El beneficio de consumir frijol ha llamado la atención en los países desarrollados debido a los beneficios que aporta a la salud, incluyendo la reducción del contenido de colesterol en sangre, la tolerancia a la glucosa, disminución de enfermedades cardiovasculares y prevención de ciertos tipos de cáncer (Guzmán y col., 2002). Dentro de los compuestos presentes en la semilla de frijol se ha sugerido que los inhibidores de proteasas, la fibra insoluble, algunos oligosacáridos y los compuestos fenólicos son los responsables del efecto terapéutico del frijol.

Sin embargo, diversos ensayos *in vitro* parecen apoyar la idea que los fenoles son los principales responsables de la prevención de las enfermedades por ser excelentes agentes antioxidantes (Clemente y Domoney, 2001).

Tabla 7. Papel tradicional y funcional de frijol.

Componente	Papel tradicional	Papel funcional
Proteína	Fuente de aminoácidos	Alternativa de proteína animal
Fibra	Reduce la constipación del sistema digestivo	Reducción de colesterol y control de insulina en sangre
Polifenoles totales	Confiere resistencia a plagas, responsables del color de la semilla	Antioxidante, reducción de enfermedades cardiovasculares
Ácido fítico	Fuente de fosforo durante la germinación	Antioxidante
Taninos	Reducen la digestibilidad de proteína	Antioxidante, antimutagénico, disminución de la presión cardiaca
Inhibidores	Disminuyen la digestibilidad de	Protección contra rotavirus,

de tripsina	proteína	anticarcinogénesis, quimioprotector
Lectinas	Confiere resistencia a plagas de almacén	Inhibición de crecimiento de linfomas

(Modificado de Guzmán y col., 2002)

3.6 Compuestos fenólicos en frijol

Los compuestos polifenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático y pueden dividirse en extraíbles (libres y conjugados) y no extraíbles (formas insolubles principalmente ligadas a polisacáridos de las paredes celulares). Constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con alrededor de 800 estructuras conocidas. Son productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos donde desarrollan diversas funciones para el buen funcionamiento de las plantas, muchos son productos de defensa contra herbívoros y patógenos, algunos le dan protección a las radiaciones UV, o funcionan como moléculas señal y algunos actúan como agentes alelopáticos (Perea, 2013).

Los ácidos fenólicos presentes en esta leguminosa se derivan de los ácidos benzoico y cinámico. Dentro del primer grupo (ácidos hidroxibenzoicos) se encuentran compuestos como el Ácido Gálico, p-Hidroxibenzoico y Vainílico; en el segundo grupo (ácidos hidroxicinámicos) están el Ácido Cumárico, Cafeico y Ferúlico. Todos estos ácidos se encuentran en forma esterificada, glicosilada y polimerizada (Luthria y Pastor, 2006).

El frijol es rico en Kaempferol, un flavonoide de bajo peso molecular formado por la combinación de derivados de Fenilalanina y Ácido Acético con un esqueleto de Difenilpirano. Entre los beneficios para la salud de los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica. Cada vez hay más estudios que evidencian que estos compuestos también actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares y que parte de esta regulación está relacionada con la capacidad de los flavonoides de alterar la estructura de la membrana celular, influyendo en procesos como señalización celular, ciclo celular, metabolismo del Ácido Araquidónico y la proliferación celular y apoptosis. Además de su conocida capacidad antioxidante, se sabe que los flavonoides juegan un papel amplio en el funcionamiento del organismo y que poseen gran cantidad de actividades biológicas como: antialérgico, antivirales, anticancerígeno, antibacterial y estimulante del sistema inmune (Porrás y López, 2009).

Los flavonoides presentes en el frijol tienen una buena actividad antioxidante ya que tanto las antocianinas como los flavonoles tienen sustituciones 3' 4' ortodihidroxi en el anillo B, otra característica que les aporta una buena actividad antioxidante son las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7 (Anexos, Figura A1). También han sido investigados por su actividad antibacterial contra Gram positivas y antifúngica. El Kaempferol presente en el frijol Mayocoba se ve favorecido en su actividad biológica

por el doble enlace en el carbono 2 (Anexos, Figura A1) y las antocianinas presentes en los frijoles de testa oscura elevan su actividad antioxidante por los grupos ceto e hidroxilo (Ugatongo, 2009).

En 2006 fueron detectados por HPLC ácidos fenólicos como ácido p-Cumárico, ácido Ferúlico y ésteres del ácido Sinápico (Figura 1). Recientemente, cultivares comerciales de frijol han sido diferenciadas por la presencia de tres antocianinas: frijol negro (Delfinidina, Petunidina y Malvidina), frijol pinto (Kaempferol) y frijol rosado (Quercetina y Kaempferol), mientras que no se detectaron flavonoides en frijoles de testa blanca (Luthria y Pastor, 2006).

El ácido p-Cumárico es muy usado en la industria por sus propiedades antioxidantes, dada su capacidad de deslocalización de electrones a lo largo de su grupo fenol y como complemento de formulaciones nutracéuticas y farmacéuticas ya que se cree que puede reducir el riesgo de cáncer de estómago mediante la inhibición de la formación de nitrosaminas, que son cancerígenos. Se ha demostrado que el ácido p-Cumárico tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de melanina en estudios *in vitro*. Además, este compuesto es capaz de inhibir la formación de eritema y la pigmentación en piel humana expuesta a radiación ultravioleta dado que posee una estructura similar a la L-tirosina (sustrato natural de la tirosinasa) y puede bloquear la acción de la enzima al unirse a su sitio activo de forma competitiva (Song y col., 2011).

El ácido Ferúlico es un compuesto que forma parte del grupo de los ácidos Hidroxicinámicos y es el más abundante en la pared celular vegetal, se encuentra enlazado covalentemente a polisacáridos a través de enlaces ésteres otorgando rigidez en su estructura y resistencia a la degradación por microorganismos, también, al poseer propiedades antioxidantes es utilizado como componente en bloqueadores solares y en la industria farmacéutica por sus propiedades anti-inflamatorias.

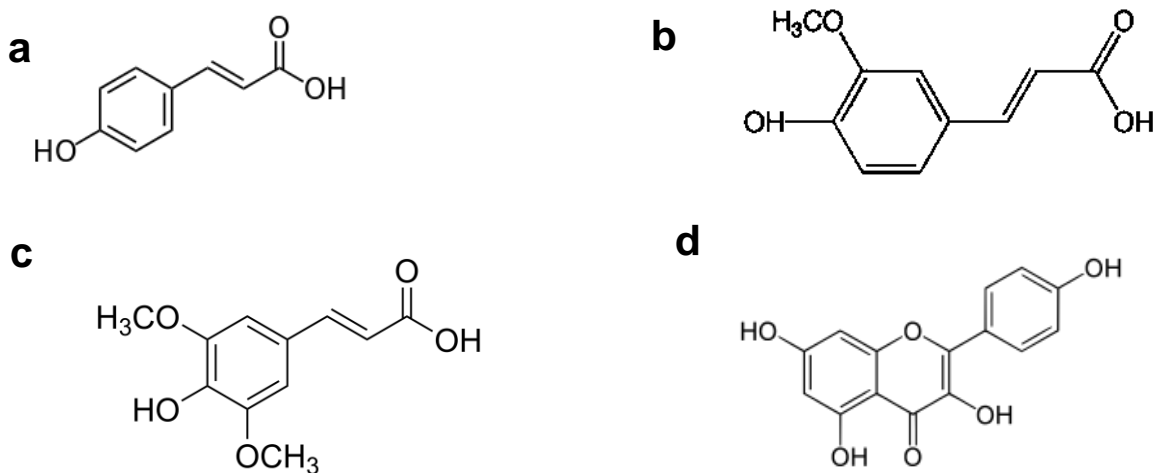


Figura 1. Estructura de fenoles simples y flavonoides presentes en frijol
a. ácido p-Cumárico, b. ácido Ferúlico, c. ácido Sinápico, d. Kaempferol

Los taninos son un grupo de compuestos hidrosolubles producidos por la condensación de compuestos fenólicos simples. Se dividen en dos clases: taninos condensados y taninos hidrolizables, son sustancias muy astringentes y de sabor amargo, que pertenecen a la familia de los polifenoles, funcionan como antioxidantes, anticancerígenos y antimutágenos efectivos. Son utilizados en la industria para preservar alimentos procesados.

En la naturaleza son comunes en diversos tejidos de plantas incluyendo hojas, tallos raíces, semillas y frutos, en el frijol se encuentra en la testa y son los responsables de la coloración de la semilla y son incorporados a un complejo polimérico que se cree la protege contra el estrés abiótico (Porrás y López, 2009). Se ha demostrado que estos compuestos son excelentes agentes antioxidantes.

3.7 Estrés oxidativo y actividad antioxidante

Dada la importancia de los compuestos fenólicos como agentes antioxidantes es necesario conocer que es el estrés oxidativo, que consecuencias provoca en el organismo y a que se le llama actividad antioxidante.

Las reacciones oxido-reductoras constituyen una parte esencial del metabolismo aeróbico en los organismos vivos y ocurren principalmente entre moléculas orgánicas. Durante el desarrollo de este tipo de reacciones en sistemas biológicos normales, como la producción de energía, fagocitosis, regulación del crecimiento celular, señalización intercelular y síntesis de compuestos como el ATP, es común que se formen sustancias reactivas de oxígeno (ERO) a manera de intermediarios, incluyendo radicales hidroxilo (OH^\cdot), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Sin embargo, el organismo puede sufrir ciertos desequilibrios que conducen a la formación de ERO con actividad de radicales libres por la transferencia de electrones desapareados, atacando los lípidos de las membranas celulares, modificando proteínas estructurales, así como carbohidratos y ADN (Erkoc y col., 2003).

Evidencia clínica y experimental ha mostrado que los radicales libres son esenciales en la fisiología normal del ser humano, pero también aceleran el proceso de envejecimiento, son intermediarios en la degeneración celular ya que tienen una acción de deterioro sobre los sistemas biológicos incluyendo la fragmentación del ADN, nitración de tioles, inhibición de enzimas que mantienen la integridad genética y daño celular. En los últimos años se ha reconocido que las enfermedades crónicas degenerativas asociadas a los problemas de cáncer, diabetes, hipertensión, obesidad, Alzheimer, Parkinson y arterosclerosis están afectando a una gran parte de la población mundial y el común denominador que precede a la enfermedad es el estrés oxidativo (Ariza y col., 2013).

Ante tal estrés las células utilizan su sistema antioxidante enzimático entre las que destacan la superóxido dismutasa (SOD) que favorece la dismutación del radical superóxido a hidroperóxido y la glutatión peroxidasa (GPX) o catalasa (CAT) que convierte el hidroperóxido en agua y oxígeno. (Santiago y col., 2007).

Existe otro sistema antioxidante no enzimático en el cual se lleva a cabo una reacción Redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un protón que puede ser captado por el radical libre, o permite la formación de ligandos que faciliten la quelación de iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) y la interacción con enzimas del sistema de defensa antioxidante.

Una herramienta clave y que está al alcance de todos para combatir el estrés oxidativo y evitar daño en las estructuras y funciones celulares es la dieta, se sabe que al incluir en ella alimentos ricos en taninos y flavonoides, se disminuye el estrés oxidativo y previene enfermedades relacionadas con la producción excesiva de radicales libres. Los nutrientes básicos que ingerimos pueden actuar por si solos neutralizando los radicales libres o ayudar a los sistemas antioxidantes enzimáticos como cofactores (Santiago y col., 2007; Granito y col., 2007; Mercado y col., 2013).

Gutteridge y Halliwell en 1990 definieron “antioxidante” como cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato.

Para que un antioxidante tenga actividad debe cumplir una característica básica que es generar un radical estable y menos dañino para la célula después de reaccionar con la especie reactiva. Actualmente es muy común el uso de antioxidantes sintéticos en la industria alimenticia para prolongar la vida útil de los productos, estos antioxidantes son donadores de protones, como el Butilhidroxianisol (BHA), el Butilhidroxitolueno (BHT), la 2,4,5-Trihidroxibutirofenona (THBP), la Tertbutilhidroquinona (TBHQ) y los Galatos.

Estos compuestos no detienen la formación de radicales, sino que reaccionan con ellos, los estabilizan y producen radicales menos activos (Badui, 2006). No obstante, existe un acuerdo generalizado en relación a que algunos antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT necesitan ser reemplazados por antioxidantes naturales debido a sus potenciales riesgos para la salud y toxicidad. Por lo anterior es común la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes provenientes de fuentes naturales como los metabolitos secundarios de plantas y alimentos como las leguminosas.

3.7.1 Actividad antioxidante de frijol

Como se mencionó anteriormente el frijol es considerado un alimento funcional por poseer compuestos fenólicos conocidos por su excelente actividad antioxidante, este efecto es demostrado en varios estudios *in vitro* e *in vivo*.

En el 2002 Guzmán Maldonado y colaboradores determinaron la capacidad antioxidante *in vitro* de los polifenoles de harina de frijol común (*P. vulgaris*) silvestre y criollo además de frijol ayocote (*P. coccineous*) por el método de neutralización del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). En este estudio se utilizaron como controles compuestos antioxidantes sintéticos como el Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) y el Butil hidroxitolueno (BHT). Se requirió la mitad de la concentración de polifenoles de las semillas de frijol crudo (de 31 a 125 μM en equivalentes de Catequina) en comparación con los antioxidantes sintéticos (de 62 a 500 μM) para obtener la misma actividad antioxidante y el mejor resultado se logró con

el extracto de frijol silvestre. Los autores remarcan la importancia de estudiar especies no comerciales como fuente de compuestos antioxidantes.

En un estudio posterior se identificaron los flavonoides Kaempferol y Quercetina, así como el ácido Cafeico y derivados glicosilados del mismo en extractos de semilla de frijol silvestre por medio de HPLC/MS, los autores señalan a estos compuestos como los responsables de la actividad antioxidante observada (Heimler y col., 2005). En otro estudio realizado por Araiza y col. (2013) se atribuye la actividad antioxidante de 5 cultivares de frijol común (*P. vulgaris*) a los flavonoides y taninos contenidos en extractos metanólicos de semilla, reportando una relación directa entre el color de la semilla, el contenido de compuestos fenólicos y una mayor actividad antioxidante contra el radical DPPH[·].

Entre los estudios que se han realizado sobre la pérdida de actividad antioxidante *in vitro* después de la cocción del frijol, Gálvez y col. (2009) realizaron una comparación de la actividad antioxidante de semillas de frijol negro (FT Nobre) y pinto (Jalo Precoce) sometidas a diferentes temperaturas de cocción con y sin remojo previo de la semilla, para este análisis primero se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos en equivalentes de Catequina por el método de Folin-Ciocalteu para después evaluar la actividad antioxidante contra el radical DPPH (Tabla 8). Se observó una correlación entre la disminución de la actividad antioxidante con la pérdida de estos compuestos.

Tabla 8. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de frijol FT Nobre y Jalo Precoce sometidos a diferentes métodos de cocción.

	Compuestos fenólicos (mg EC/ g)	Actividad antioxidante (μM ET/g)
FT Nobre		
CRUDO	2.2 \pm 0.1 a	5.8 \pm 0.4 a
S/R 121° C	1.5 \pm 0.1 b	3.7 \pm 0.2 b
C/R 100° C	0.5 \pm 0.03 c	1.9 \pm 0.1 c
Jalo Precoce		
CRUDO	2.4 \pm 0.1 a	6.4 \pm 0.6 a
S/R 121° C	1.5 \pm 0.2 b	4.1 \pm 0.3 b
C/R 100° C	0.7 \pm 0.4 c	2.6 \pm 0.1 c

S/R: Sin remojo previo, C/R: Con remojo previo, EC: Equivalentes de Catequina, ET: Equivalentes de TROLOX, letra diferente en cada columna indica diferencia significativa $p < 0.05$

La mayoría de los estudios acerca de la actividad antioxidante del frijol *in vivo* se han realizado con semilla cruda y solo ven el efecto del consumo de frijol en la prevención de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo. Thompson y colaboradores (2012), utilizaron ratas Sprague-Dawley inducidas a cáncer de mama para estudiar el efecto del consumo del frijol en la prevención de esta enfermedad. Se le adicionó a su dieta un 7.5, 15, 30 y 60 % de harina de frijol. Los autores reportan que la masa de carcinomas

por rata y la multiplicidad (número promedio de tumores por rata) se redujo un 62.2% en ratas alimentadas con frijol, también se observó una correlación positiva entre la cantidad de frijol en la dieta de las ratas y una disminución de la carga y multiplicidad tumoral. Los resultados indican que la inducción de apoptosis y la relación de las enzimas Bax/Bcl-2 (a través de la vía intrínseca mitocondrial) es dependiente a la concentración de frijol ingerida y atribuyen este efecto a la capacidad antioxidante de los fenoles, la cual fue determinada en ensayos *in vitro*.

De las pocas investigaciones sobre la actividad biológica de frijol sometido a cocción encontramos el trabajo realizado por Reynoso y Col (2007), quienes realizaron un estudio *in vivo* cuyo objetivo fue ver el efecto del consumo de frijol cocido sobre la incidencia de cáncer de colon, para esto utilizaron ratas Sprague-Dawley inducidas a cáncer de colon con Dimetilhidrazina (DHM) y alimentadas con harina de frijol Pinto Zapata, Flor de Mayo y Blanco Tlaxcala en una concentración de frijol equivalente al consumo que tiene una persona al año (11 kilogramos). La cocción del frijol se realizó en autoclave (121°C por 30 minutos) y se observó que las ratas alimentadas con frijol Blanco y Pinto Zapata presentaron una menor incidencia de presentar cáncer de colon además de un menor número de lesiones tumorales. Los autores atribuyeron este efecto protector a los compuestos fenólicos y proteínas presentes en la semilla de frijol que se conservan incluso después de la cocción.

Así mismo, Lomas (2008) realiza un estudio para evaluar el efecto de frijol común cocido en la regulación de niveles de glucosa en ratas Wistar inducidas a diabetes por Estreptozotocina (STZ), ya que se sabe hay una excesiva producción de ERO en esta enfermedad lo cual ocasiona un desorden metabólico y una alta concentración de glucosa. Los cultivares utilizados fueron frijol Pinto Durango y Negro 8025 cocidos a 96°C hasta lograr una cocción homogénea y a la harina de frijol cocido se le determinó la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Tabla 9).

Posteriormente esa harina se adicionó al alimento comercial en una proporción del 3% y 50% que, según los autores, es equivalente al consumo *per capita* urbano y rural respectivamente. Para el estudio se hicieron dos bloques de ratas con 5 grupos cada uno, al primer bloque se les inyectó STZ a una concentración de 45 mg/kg de peso corporal para simular una etapa temprana de la enfermedad, mientras que al segundo bloque se les administró STZ a una concentración de 55 mg/kg de peso corporal para ver el efecto de la dieta con frijol en una etapa avanzada de diabetes (Tabla 10).

Tabla 9. Concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de frijol Pinto Durango y Negro 8025.

	Pinto Durango	Negro 8025
Ácidos fenólicos ¹	0.63 ±0.01 b	0.92 ± 0.06 a
Capacidad antioxidante ²	94.35 ± 5.00 b	112.18 ±3.08 a

¹ mgEAG/g

² Método ABTS, μM TROLOX/g

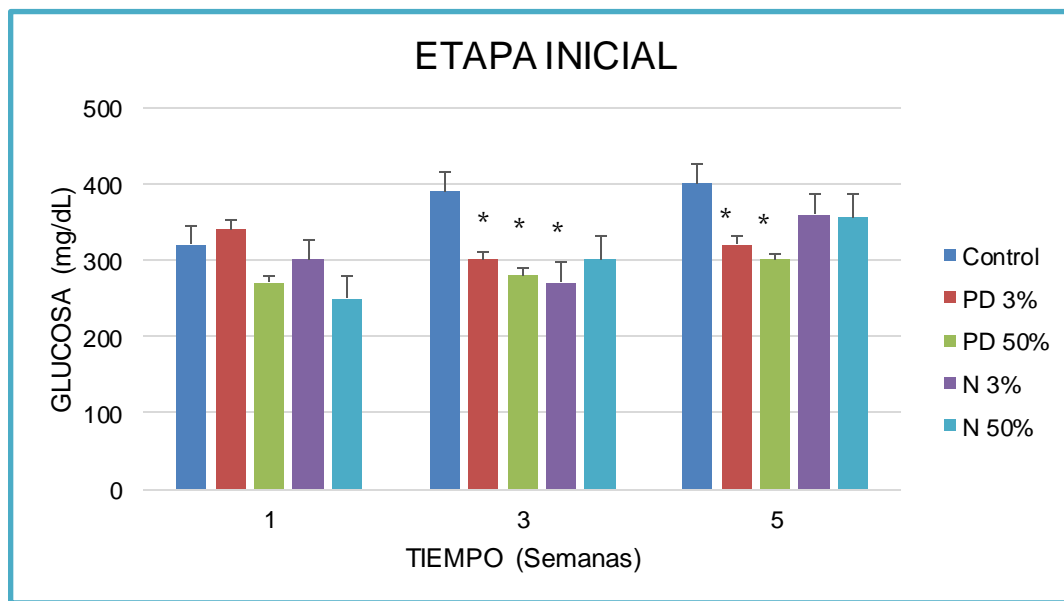
Se cuantificó el nivel de glucosa en sangre por 5 semanas y los resultados mostraron que hubo una disminución en los niveles de glucosa solo en el bloque uno (etapa temprana) y el mejor resultado se obtuvo en ratas alimentadas con frijol Pinto Durango al 50% (Figura 2). Los autores concluyen que el efecto del consumo de frijol es preventivo y atribuyen la disminución en los niveles de glucosa a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en la harina de frijol observada en la prueba *in vitro* aún después de una cocción.

En este estudio no se encontró una correlación entre la actividad antioxidante observada *in vitro* y la acción *in vivo* del frijol negro, evidenciando la necesidad de realizar estudios de actividad antioxidante *in vivo* y su posible implicación en prevención de enfermedades como la diabetes antes de dar una recomendación sobre el consumo de un tipo específico de frijol.

Tabla 10. Bloques y grupos de ratas Winstar con dieta adicionada con harina de frijol cocido.

ETAPA INICIAL		
GRUPO	RATAS	DIETA
1	Diabéticas	Alimento comercial
2	Diabéticas	Frijol Pinto Durango 3%
3	Diabéticas	Frijol Pinto Durango 50%
4	Diabéticas	Frijol Negro 8025 3%
5	Diabéticas	Frijol Negro 8025 50%
ETAPA AVANZADA		
GRUPO	RATAS	DIETA
1	Diabéticas	Alimento comercial
2	Diabéticas	Frijol Pinto Durango 3%
3	Diabéticas	Frijol Pinto Durango 50%
4	Diabéticas	Frijol Negro 8025 3%
5	Diabéticas	Frijol Negro 8025 50%

(Modificado de Lomas, 2008)



* Diferencia significativa ($p < 0.05$) Prueba Dunnet, PD= Pinto Durango, N= Negro 8025

Figura 2. Nivel de glucosa en ratas Wistar diabéticas alimentadas sometidas a una dieta adicionada con harina de frijol (Lomas, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

México es el segundo centro de diversificación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), que es un alimento de suma importancia por el consumo *per capita* en el país y considerado un alimento funcional.

Se han encontrado diversos compuestos en varias especies y cultivares de *Phaseolus* que presentan actividad biológica como capacidad antioxidante, disminución en los niveles de colesterol, efectos anticancerígenos debido a las propiedades antiproliferativas de sus compuestos fenólicos, lectinas e inhibidores de proteasas, así como efectos sobre diabetes y obesidad. Estudios demuestran que los radicales libres por una parte son esenciales en la fisiología del ser humano, pero también aceleran el proceso natural de envejecimiento y son responsables de la degeneración celular causando la fragmentación del ADN, nitrosación de tioles, inhibición de enzimas que mantienen la integridad genética y daño celular en enfermedades como Alzheimer, Parkinson, arterosclerosis, cáncer y diabetes. El frijol es una fuente poco estudiada de compuestos fenólicos ya que en la literatura se destacan las berries (zarzamora, frambuesa, arándano) y el vino tinto por su alto contenido de antocianinas y taninos. Sin embargo, estos productos tienen un precio elevado en el mercado, y en las berries se trata de un alimento perecedero. Por lo que el frijol puede ser una fuente de compuestos con actividad antioxidante accesible para toda la población y en todas las épocas del año.

La mayoría de los estudios reportan los efectos benéficos de extractos de *Phaseolus vulgaris* por lo que se necesita realizar estudios donde se pueda relacionar el contenido de compuestos fenólicos en frijol criollo y comercial, así como su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y su posible implicación en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas además de conocer la forma más adecuada de cocción para obtener el mayor beneficio de este alimento.

5. HIPÓTESIS

El frijol criollo tiene mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en comparación al frijol comercial y dicha actividad se conserva mejor con el método moderno de cocción

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en frijol criollo y comercial, así como el efecto del método de cocción sobre estas variables.

6.2 Objetivos particulares

1. Analizar el efecto del método de cocción sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* en frijol criollo y comercial.
2. Realizar un análisis comparativo del perfil de compuestos fenólicos de frijol con actividad antioxidante contrastante.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Alubia (*Phaseolus lunatus*) y frijol Escumite (*Phaseolus acutifolius*) (Tabla 11). Se seleccionó una semilla criolla y una comercial de cuatro diferentes colores de testa para comparar la cantidad de compuestos fenólicos según el tipo de semilla (Figura 3).

Tabla 11. Clasificación de cultivares y especies utilizadas.

ESPECIE	NOMBRE COMUN	COLOR
Criolla		
<i>P. lunatus</i>	Alubia blanca	Blanco
<i>P. acutifolius</i>	Escumite	Pinto
<i>P. vulgaris</i>	Rojo sangre de toro	Rojo
	Negro de vara	Negro
Comercial		
<i>P. vulgaris</i>	Peruano	Blanco
	Pinto	Pinto
	Rojo	Rojo
	Negro Jamapa	Negro



Figura 3. Semillas de frijol utilizadas según su color y tipo de semilla (parte superior criollo, inferior comercial).

7.2 Cocción

7.2.1 Remojo

Se dejaron remojar 20 g de semilla de frijol en 100 mL de agua potable durante 18 horas.

7.2.2 Cocción en olla de barro (Método tradicional)

La cocción se realizó de acuerdo a la receta tradicional mexicana a presión atmosférica, descartando el agua de remojo. Se colocaron los 20 g de frijol en una olla de barro con 2 L de agua potable y se cocinaron durante 180 minutos. Al término de la cocción se retiró el agua excedente y se realizó una pasta con ayuda de un mortero.

7.2.3 Cocción en olla de presión (Método moderno)

Se colocaron 20 g de semilla en una olla express (15 lb de presión) con 150 mL de agua, el tiempo de cocción fue de 45 minutos, que es el tiempo recomendado por el fabricante, éste se inició cuando salió vapor por la válvula de presión. Después de ese tiempo se retiró el agua excedente, se molió hasta una consistencia de pasta.

7.2.4 Freído

Se tomaron 10 g de la pasta resultante de cada método de cocción y se colocaron en un sartén con aproximadamente 5 mL de aceite comestible de canola marca Maravilla durante 5 minutos a fuego medio hasta obtener una consistencia de puré.

Todas las muestras resultantes de los diferentes tipos de procesamiento térmico fueron guardadas en bolsas de plástico a -20° C hasta su uso.

7.3 Extracción metanólica

7.3.1 Semilla cruda

Para la extracción se molieron 15 g de cada semilla de frijol hasta obtener una harina fina. Una vez molida se pesó 1 g de harina y se adicionaron 50 mL de una solución de metanol: HCl 50:1(% en volumen) en un matraz Erlenmeyer cubierto con papel aluminio para evitar degradación de compuestos, este procedimiento se realizó por triplicado, para posteriormente colocarlo en agitación a temperatura ambiente por 24 h, (este procedimiento se repitió dos veces más con cambio de solución cada día). Después de una filtración en oscuridad con papel filtro Whatman™ No. 1 se concentró el contenido del matraz en un rotavapor R-210 (Büchi, USA) a una temperatura de 45°C. El extracto obtenido fue recuperado en 3 mL de metanol al 50% y almacenado a 4°C en viales color ámbar hasta su utilización.

7.3.2 Semilla cocida y frita

Para la semilla sometida a cocción y freído por cada uno de los métodos utilizados se pesó un gramo de pasta y se siguió el mismo procedimiento empleado para semilla cruda.

7.4 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu reportado por Wan y col. (2011), con adecuaciones para placa de 96 pozos. Se colocaron en cada pozo de la placa 2 µL de la muestra, 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N (SIGMA); después de 4 minutos se adicionaron 40 µL de Na₂CO₃ al 7.5% y finalmente 158 µL de agua destilada. Se dejó reposar la placa por 90 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia de la placa en un espectrofotómetro (BioTek) a una longitud de onda de 760 nm.

El análisis de cada muestra de semilla de frijol se realizó por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos se calculó con base en una curva de calibración de ácido Gálico (Anexos, Figura B1). Los resultados obtenidos se expresan en miligramos de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de muestra (mgEAG/g). Se usó metanol al 50% como control negativo.

7.5 Determinación de la actividad antioxidante

7.5.1 Actividad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante es determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos y por el modo de acción de cada uno, por ello es necesario evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por más de un método. Para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se utilizaron 3 técnicas colorimétricas con los radicales 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) (Brand y col, 1995) y el Ácido 2-2'-Azino-bis 3-etilenbenzotiazonilo-6 sulfónico (ABTS^{•+}) (Re y col, 1999) así como el poder

antioxidante reductor de Hierro (FRAP) (Benzie y Strain, 1996) reportadas por Ayala (2014) y adecuadas para placas de 96 pozos. Para esta determinación se normalizaron los extractos de frijol a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ con la finalidad de estimar la potencia del extracto a partir de una misma concentración de compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante se calculó con base en una curva de calibración de Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) para cada método (Anexo C) y los resultados de las tres técnicas se expresan en μM de equivalentes de TROLOX/ μM TROLOX/ mL (μM TROLOX/ mL).

Ensayo de neutralización del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]): El radical DPPH[•] posee un electrón desapareado y la deslocalización de ese electrón le otorga una coloración violeta. Cuando este radical entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno se produce su forma reducida con la consecuente pérdida de color y por lo tanto de absorbancia.

El radical DPPH[•] se preparó a partir de un stock (10 mM) diluyéndolo con metanol al 80% hasta una concentración final de 0.1 mM. Se colocaron 10 μL de cada extracto normalizado y se adicionaron 140 μL del radical DPPH[•] y se utilizó metanol al 50% como control. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos protegidas de la luz y por triplicado, después de lo cual se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrómetro UV-Vis para microplacas (Epoch, BioTek, USA).

Ensayo de neutralización del Ácido 2-2'-Azino-bis 3-etilenbenzotiazonilo-6 sulfónico (ABTS^{•+}): El radical catiónico ABTS^{•+} es de color azul verdoso, al estar en contacto con una antioxidante se produce su neutralización caracterizada por la pérdida de color. La solución de trabajo se preparó el día del ensayo en la cual se mezcló el radical catiónico ABTS^{•+} 14 mM con Persulfato de Potasio 2.6 mM (SIGMA) en partes iguales y se colocó en agitación por 90 minutos en ausencia de luz hasta que se desarrolló un color verde oscuro, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 739 nm y se ajustó con metanol hasta una absorbancia final de 0.8.

En microplacas de 96 pozos se colocaron 10 μL de cada extracto normalizado y se adicionaron 190 μL de la solución de trabajo. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y protegida de la luz, después de lo cual, se midió la absorbancia a 739 nm en un espectrómetro UV-Vis para Microplacas (Epoch, BioTek, USA).

Evaluación del poder antioxidante reductor de Hierro (FRAP): En el ensayo FRAP (por sus siglas en inglés "Ferric Reducing Antioxidant Power") los compuestos antioxidantes reducen el complejo Fe (III)-Tripiridiltriiazina en su forma ferrosa de color violeta. Para este ensayo se elaboró la solución de trabajo el día del ensayo para la cual se mezcló Acetato de Sodio 300 mM a pH de 3.6, Cloruro Férrico 20 mM y TPTz (2, 4,6-tripiridil-s-triazina) 10 Mm (SIGMA) en proporción 10:1:1 y se colocó en agitación a 37° C por 10 minutos en obscuridad. Para el ensayo se colocaron 10 μL de cada extracto normalizado y 150 μL de la solución de trabajo en placas de 96 pozos y se dejó estabilizar la reacción por 20 minutos en ausencia de luz. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 593 nm en un espectrómetro UV-Vis para microplacas (Epoch, BioTek, USA).

Para ver la correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* se multiplicó el valor obtenido a una concentración de 10 µg/mL de compuestos fenólicos por la cantidad total contenida en el extracto crudo.

7.5.2 Actividad antioxidante *in vivo*

Como modelo biológico para evaluar la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó al nemátodo *Caenorhabditis elegans* por ser un modelo muy manejable en laboratorio, ciclo de vida corto y en el cual se pueden observar los efectos de un estrés oxidativo.

Es un organismo hermafrodita que se alimenta de la bacteria *Escherichia coli* y tiene un ciclo de vida de 2 a 3 semanas. En etapa adulta mide 1 mm aproximadamente y es capaz de colocar entre 200 y 300 huevos a lo largo de su vida, al eclosionar, el nemátodo pasa por cuatro estados larvarios antes de llegar a la etapa adulta. Durante su segundo estado larvario (L2) y en caso de sobrepoblación o ausencia de alimento, *C. elegans* puede entrar a un estadio alternativo con mayor resistente al medio y al envejecimiento. A partir del cuarto estado larvario (L4) son capaces de producir espermatozoos y en etapa adulta pueden generar huevos (Figura 4) (Priess y Hirsh,1986).

C. elegans se utiliza comúnmente como modelo para diversos estudios de enfermedades como diabetes, obesidad o el envejecimiento prematuro (Moreno y col., 2014). En el caso de diabetes la vía de señalización de la insulina en este nemátodo es similar a la humana y regula tanto el metabolismo como el desarrollo y la longevidad.

Schlotterer y col. (2009) reportan que una concentración de 40 mM de glucosa en *C. elegans* es equivalente a la concentración de glucosa en sangre de un paciente diabético y acorta el ciclo de vida del nemátodo al igual que se reduce la expectativa de vida en personas con diabetes.

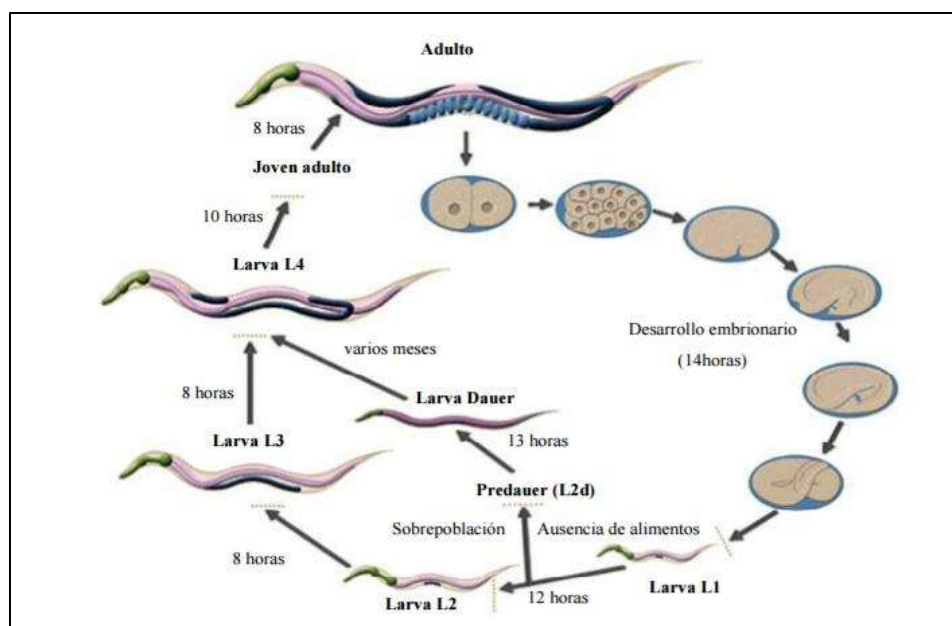


Figura 4. Ciclo de vida del nemátodo *C. elegans* (Wormatlas)

7.5.2.1 Estrés oxidativo causado con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Los extractos de frijol fueron normalizados a concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos con medio M9. *C. elegans* N₂ (WT) fue cultivado en medio de crecimiento de nemátodos (NGM) (Anexo D1) en caja de Petri con *E. coli* OP50 en la superficie del medio a una temperatura de 18°C.

Para el ensayo de actividad antioxidante se colocó *C. elegans* (en etapa adulta) en placa de 96 pozos con medio M9 (Anexo D2) en presencia del extracto normalizado y se dejó incubar la placa por 48 horas en oscuridad a 18° C, transcurrido ese tiempo se realizaron lavados con medio M9 y se agregaron concentraciones de 5, 10 y 15 mM de H_2O_2 para causar un estrés oxidativo. Se realizó un conteo de nemátodos cada hora por un tiempo total de 6 horas y se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) de H_2O_2 por medio de una regresión lineal en el tiempo con un coeficiente de determinación (R^2) > 0.80.

7.5.2.2 Estrés oxidativo causado por alta concentración de glucosa

Sincronización de crecimiento: Para este ensayo se requirió que *C. elegans* estuviese en etapa adulta, para esto se sincronizó su crecimiento basado en el procedimiento descrito por Solís y Petrascheck (2011). Se recolectaron nemátodos de 5 a 10 días de vida en 10 mL de agua estéril y se centrifugó a 280 g por 2 min, se retiró el sobrenadante y se adicionó 5 mL de solución de hipoclorito alcalino al 20%.

Después de una incubación por 5 min se realizaron lavados con medio M9 con una centrifugación por 2 min a 1100 g entre cada uno, posteriormente se dejó en agitación orbital 12 horas, para después agregar Fluorodeoxiuridina (FDU) a una concentración de 0.3 mg/mL para inhibir su reproducción.

Ensayo de tiempo de vida: *C. elegans* en etapa adulta se traspasó a medio NGM adicionado con 80 mM de glucosa, extracto de frijol a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos totales, *E. coli* OP50 (muerta) y FDU (0.3 mg/mL) en placa de 12 pozos. Se registró el número de nemátodos por 25 días, también se utilizaron medios de cultivo sin glucosa y sin compuestos fenólicos como controles (Figura 5). Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia.

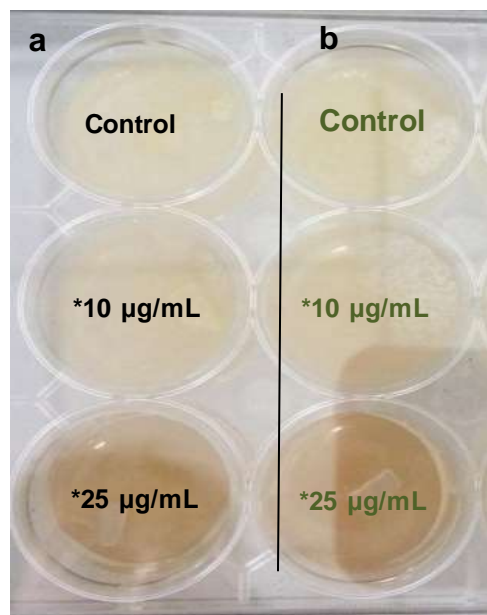


Figura 5. Ensayo de tiempo de vida en *C. elegans*
 a) Medio sin glucosa. b) Medio con glucosa, *concentración de compuestos fenólicos

7.6 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por HPLC

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante se eligieron extractos de semillas de frijol con resultados contrastantes con el fin de identificar diferencias en sus perfiles y cambios según el método de cocción utilizado.

Se inyectaron 30 µL del extracto previamente filtrado, en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Agilent Serie 1200) con inyección manual con un loop de 20 µL y detector UV de longitud de onda múltiple.

La separación se efectuó en una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 y se utilizaron las siguientes soluciones como solventes de elusión:

Solución A: Agua acidificada con 0.1% Ácido O- fosfórico

Solución B: Metanol 50% acidificado con Ácido O- fosfórico 0.1%

El método utilizado para la determinación del perfil de compuestos a un flujo de 0.8 mL/min fue el siguiente:

Tiempo (min.)	Solventes (%)	
	A	B
0-15	80	20
15-15.1	87.5	12.5
15.1-22	100	0
22-32	20	80
32-34	0	100
34-40	80	20

Para la detección de los compuestos presentes se registró la absorbancia a longitudes de onda de 250 nm, 280 nm y 320 nm y para la identificación de los compuestos presentes en los extractos metanólicos se inyectaron 30 μ L de los ácidos Gálico, p-Cumárico, 3,4 Dihidroxibenzoico, Quínico, Rosmarínico, Cafeico, Transcinámico, p-Hidroxibenzoico, Ferúlico y Clorogénico a una concentración de 0.06 μ g/mL.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y una prueba de medias Tukey usando el programa STATISTICA 8.0 considerando $p < 0.05$ como probabilidad mínima aceptable para las diferencias entre medias.

8. RESULTADOS

8.1 Cocción

Cocción en olla de barro (Método tradicional)

Las semillas, que se sometieron a un remojo previo a la cocción, tuvieron varios cambios físicos como un aumento en el volumen del grano, el reblandecimiento de la testa, cambio de color tanto en la semilla como en el agua de remojo.

El tiempo de cocción fue de aproximadamente 3 horas y no fue uniforme pues se presentaron granos de diferente textura de acuerdo al tipo de semilla. Se tuvo un gasto considerable de agua (2 L) presentado una coloración según el cultivar.

Cocción en olla a presión (Método moderno)

Esta cocción requirió un tiempo de 45 minutos para todos los cultivares, se observó una cocción uniforme de las semillas a comparación del método tradicional de cocción y el color del agua de cocción fue oscuro.

Un menor tiempo de cocción y una temperatura más alta en este método se reflejó en el contenido de compuestos fenólicos (Figura 6).

8.2 Contenido de compuestos fenólicos

Frijol crudo

Se observó que las semillas de frijol comerciales poseen mayor contenido de compuestos fenólicos que las semillas criollas del mismo color a excepción del frijol de color rojo donde no hubo diferencia significativa entre la semilla comercial y la criolla (Figura 6). El contenido de compuestos fenólicos en las semillas criollas varió desde 1.10 mgEAG/g para el frijol Escumite hasta 3.27 mgEAG/g para el frijol Rojo sangre de toro y para las semillas comerciales el contenido varió desde 2.32 mgEAG/g para el frijol Peruano hasta 3.77 mgEAG/g para el frijol Pinto (Figura 6), no encontrando ninguna relación entre el color de la semilla y la cantidad de compuestos fenólicos.

Frijol cocido y frito

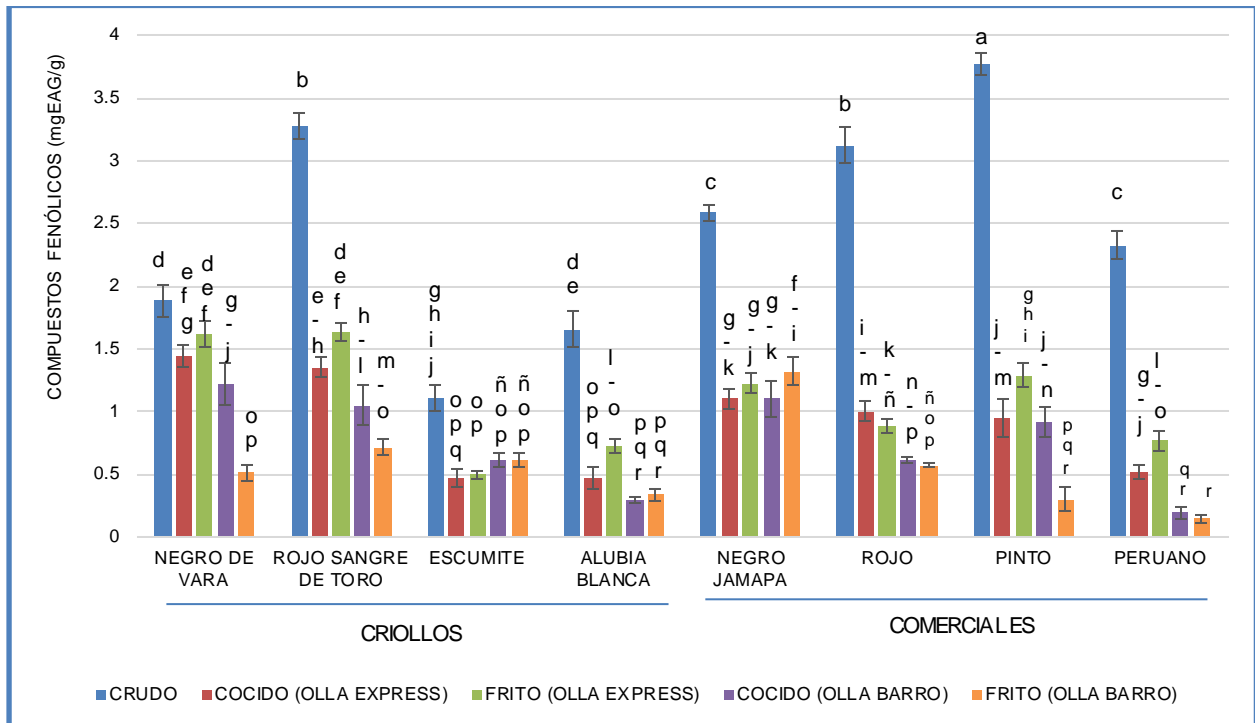
El método de cocción en olla express generó menores pérdidas en el contenido de compuestos fenólicos (59 %) con respecto al método tradicional (67%). El frijol Negro de vara tuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos entre los frijoles cocidos (1.44 mgEAG/g en olla express y 1.21 mgEAG/g en olla de barro) con un porcentaje de pérdida del 23% y 35% respectivamente, mientras que el cultivar con menor contenido fue el frijol Peruano (0.51 mgEAG/g en olla express y 0.19 mgEAG/g en olla de barro) con una pérdida del 78% en la cocción en olla express y hasta un 93% con el método tradicional respecto a su valor crudo (Figura 6).

Con respecto al frijol frito solo hubo una pérdida del 55.2% en promedio en comparación con los valores obtenidos con las semillas crudas y no se observó un cambio significativo en el contenido de compuestos fenólicos respecto al frijol cocido con excepción de los frijoles Rojo sangre de toro y Pinto donde se observa un incremento significativo después del freído en comparación a la semilla cocida en olla express. Cuando la semilla fue cocida en olla de barro y después freída se observa lo contrario, es decir, una disminución en el contenido de compuestos fenólicos.

Los frijoles Escumite y Negro Jampa mantienen un contenido estable de compuestos fenólicos después de la cocción independientemente del método utilizado e inclusive después de una segunda cocción como es el freído (Figura 6).

Tanto en frijol crudo como cocido se observó una mayor cantidad de compuestos fenólicos en las semillas comerciales con respecto a las semillas criollas (Figura 7) y en semillas de colores oscuros (negro y rojo) en comparación con semillas de colores claros (pintos y blancos) (Figura 8). Solo considerando el método de cocción, se observó que no hay diferencia en el contenido de compuestos fenólicos entre el método

tradicional y el moderno (Figura 9). Para el comportamiento de las variables de método de cocción, tipo y color de semilla ilustradas en las figuras 7, 8 y 9 no se muestra el análisis estadístico ya que fueron obtenidas mediante un modelo multivariado, el cual se usó solo como herramienta exploratoria para describir el comportamiento de estas variables. Esta consideración aplica para la cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro*.



MF ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ $n=6$; barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos en diferentes semillas de frijol crudas y cocidas.

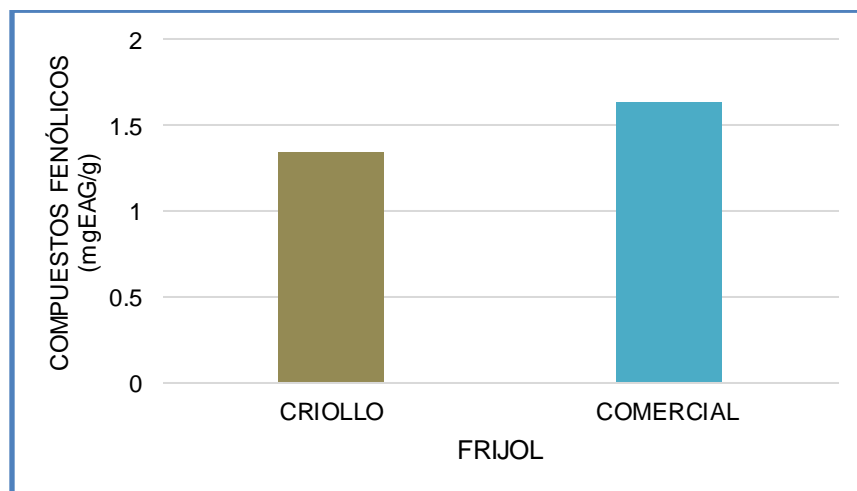


Figura 7. Contenido de compuestos fenólicos en frijol criollo y comercial.

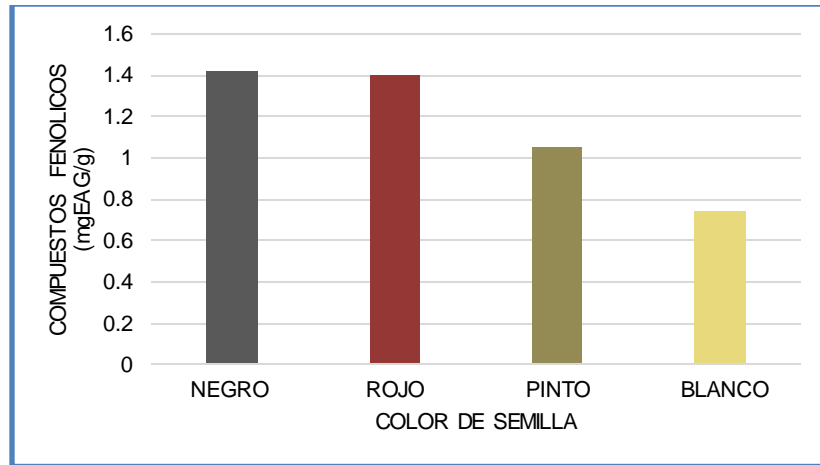


Figura 8. Contenido de compuestos fenólicos en frijol según el color de la semilla.

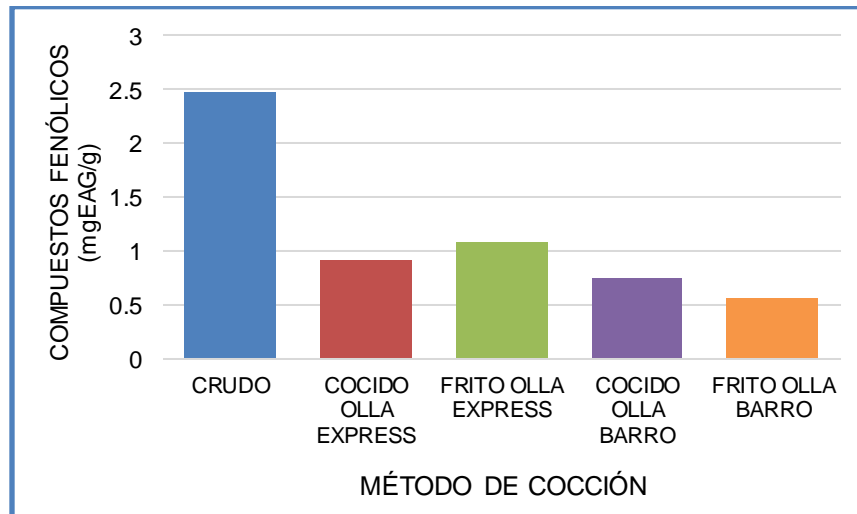


Figura 9. Contenido de compuestos fenólicos en frijol según el método de cocción.

8.3 Actividad antioxidante

8.3.1 Actividad antioxidante *in vitro*

Para la determinación de actividad antioxidante *in vitro* se normalizaron los extractos de frijol a una concentración de 10 µg/mL con la finalidad de evaluar la potencia de estos a partir de una misma concentración de compuestos fenólicos. Posteriormente se analizó la correlación entre estos dos parámetros mediante la estimación de la actividad antioxidante con base en el contenido de fenoles totales obtenido por Folin - Cioucalteu.

Frijol crudo

En la prueba con el radical DPPH[•] se vio una mejor actividad antioxidante con las semillas de frijol comercial en comparación con las semillas criollas (Figura 10 panel a)

y la mayor actividad se observó con el extracto de frijol Rojo (484 μ MTROLOX/mL). En la prueba de reducción de hierro FRAP se vio una actividad muy dispersa entre semillas criollas y comerciales. El mejor resultado se obtuvo con el extracto de frijol Escumite con un valor de 138 μ MTROLOX/mL (Figura 11 panel a) y en la prueba con el radical ABTS⁺, los frijoles comerciales de color negro y pinto tuvieron mejor actividad que los frijoles criollos. Sin embargo, la Alubia blanca fue superior que el frijol Peruano y en los frijoles de color rojo no hubo diferencia significativa entre la semilla criolla y la comercial. Fue el frijol Rojo el que obtuvo la mayor actividad antioxidante (211 μ MTROLOX/mL) en esta prueba (Figura 12 panel a). El cultivar con menor actividad antioxidante en las pruebas FRAP y ABTS⁺ fue el frijol Negro Jamapa con 64 y 130 μ MTROLOX/mL respectivamente.

Frijol cocido y frito

Existe una pérdida de actividad antioxidante después de cualquier método de cocción, sin embargo, no se observa una pérdida total de actividad. Se observa una menor disminución de la actividad antioxidante mediante cocción en olla express, con un intervalo de disminución de 2 a 39% para ABTS⁺, de 0.6 a 13 % para DPPH⁻ y de un 2 a un 58% para FRAP. Por el otro lado cuando la cocción fue con el método tradicional se tuvieron pérdidas en un rango de 19 a 84 % dependiendo el tipo de semilla y el radical utilizado.

En el ensayo de neutralización del radical DPPH⁻ el frijol Escumite sometido al método en olla express (cocción y freído) tan solo pierde un 1 y un 5% respectivamente, por otro lado, con el método tradicional perdió un 20 en la cocción y 82% en el freído (Figura 10, panel a). El frijol Rojo perdió un 8% de su actividad al cocerse en olla express y un 40% después del freído, mientras que con el método tradicional se perdió un 50% de la actividad y no hubo diferencia significativa entre frijol cocido y frito. En este ensayo se tuvo una correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de 0.89 (Figura 10, panel b).

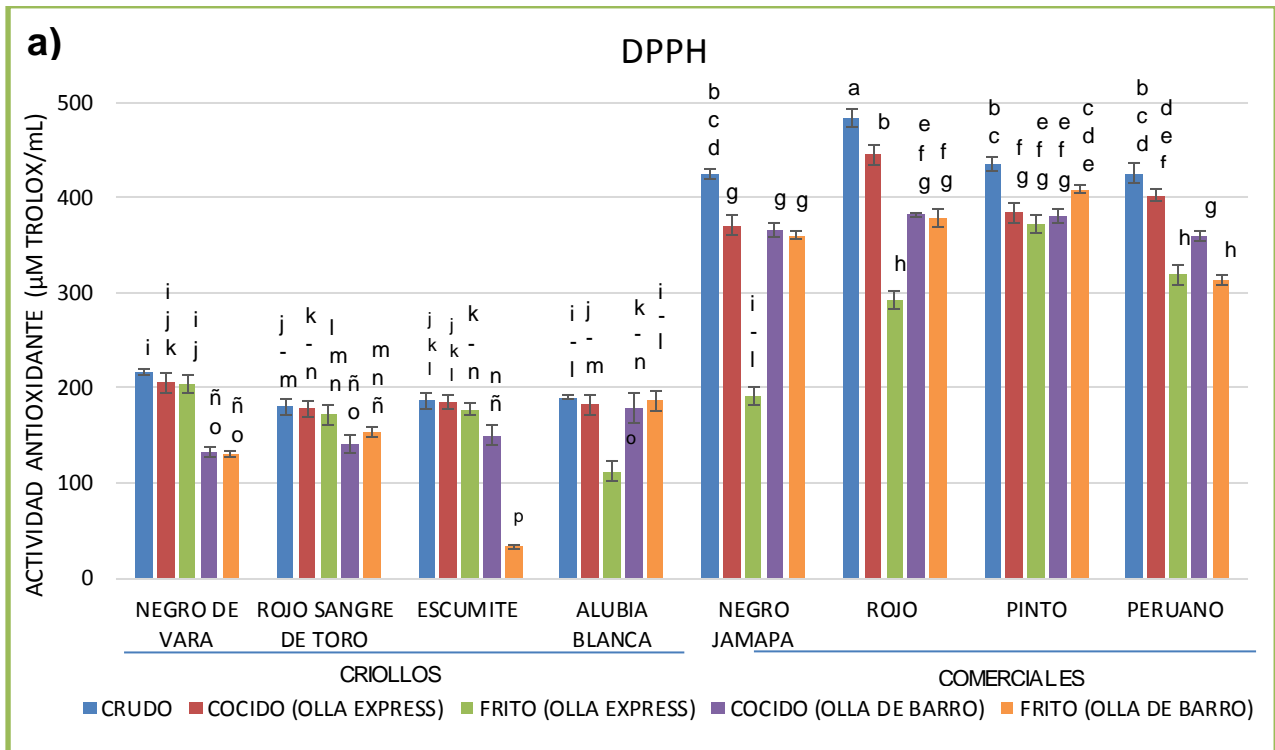
En el ensayo FRAP el frijol con mayor actividad antioxidante fue el Escumite, este frijol perdió tan solo un 2% de su actividad cocido en olla express y un 21% después de freírlo. Sin embargo, con el método tradicional (cocción y freído) se perdió un 61 y un 84% respectivamente, por lo que fue, también, la semilla con mayor pérdida de actividad en esta prueba (Figura 11, panel a). Dentro de las semillas criollas el frijol Negro de vara tuvo una pérdida significativa de actividad con los dos métodos de cocción. El frijol Rojo sangre de toro y Escumite solo tuvieron una pérdida de actividad significativa con el método tradicional de cocción y la Alubia blanca tuvo una disminución de actividad antioxidante significativa con la cocción en olla de barro y después de ser frito procedente de la cocción en olla express.

Con las semillas comerciales se tuvieron pérdidas significativas de actividad con los extractos de frijol Rojo, Pinto y peruano por los dos métodos de cocción y la disminución en la actividad con extracto de frijol Negro Jamapa solo es significativa cuando la semilla fue cocida con el método tradicional de cocción y frita después de la cocción con el método moderno (Figura 11, panel a). Con este método se tuvo una

correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de 0.92 (Figura 11, panel b).

Con el radical ABTS⁺ la mayor pérdida de actividad registrada fue en el frijol Negro de vara, el cual perdió 39% después de la cocción en olla express y un 69% con el método tradicional. En cuanto a las semillas criollas hubo una diferencia significativa en la disminución de actividad en las semillas de frijol Negro de vara y Escumite, independientemente del método de cocción utilizado; en el caso del frijol Rojo sangre de toro y Alubia blanca la pérdida de actividad fue significativa solo con el método de cocción tradicional y con el extracto de semilla frita procedente de cocción con el método moderno. En las semillas comerciales hubo una pérdida significativa en la actividad antioxidante con los extractos de frijol Negro Jamapa, Pinto y Peruano con los dos métodos de cocción; en el caso del frijol Rojo solo fue significativo el cambio con el método de cocción tradicional y semilla frita procedente de cocción con el método moderno (Figura 12, panel a). Con esta técnica se tuvo la mayor correlación (0.94) entre la cantidad de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los tres ensayos establecidos en este trabajo (Figura 12, panel b).

En el análisis comparativo de la actividad antioxidante en los diferentes tipos de semilla (criolla y comercial), se observó una mayor actividad antioxidante con el radical DPPH- en semillas comerciales en comparación a las semillas criollas, en la prueba FRAP y con el radical ABTS⁺ no hay ninguna diferencia entre estos dos tipos de semilla (Figura 13). Por otro lado, no se observó alguna diferencia en la actividad antioxidante según el color de la semilla o método de cocción en ninguna de las tres técnicas utilizadas en este estudio (Figuras 14 y 15).



MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, $n=3$, barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

b)

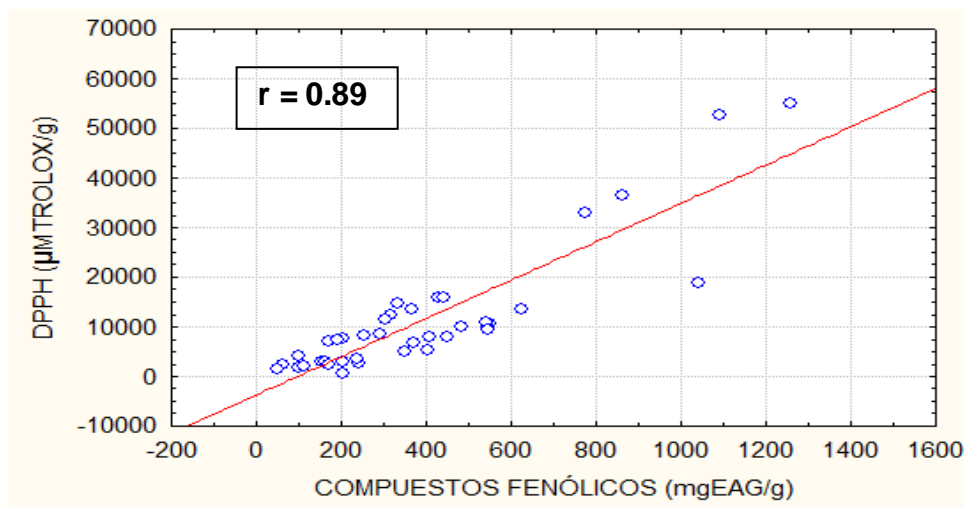
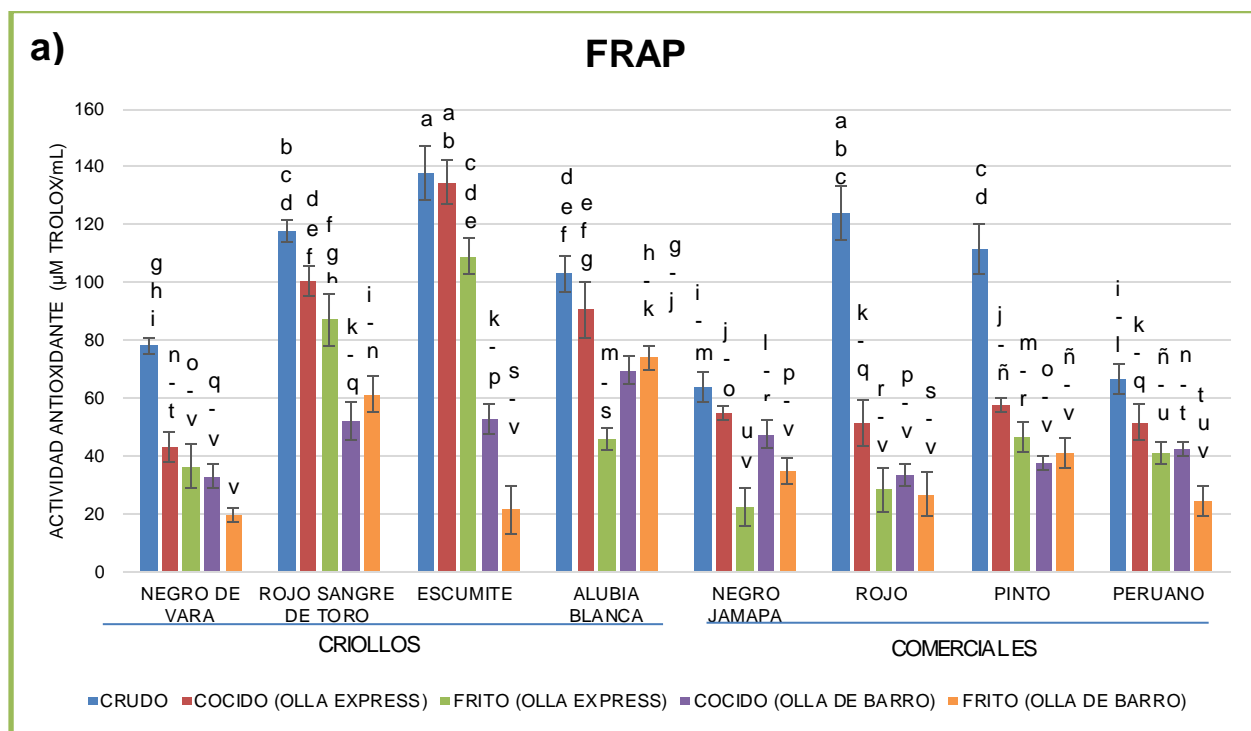


Figura 10. Actividad antioxidante de frijol por la técnica de DPPH.

a) Actividad antioxidante según el método de cocción, b) Correlación entre contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.



MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, $n=3$, barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

b)

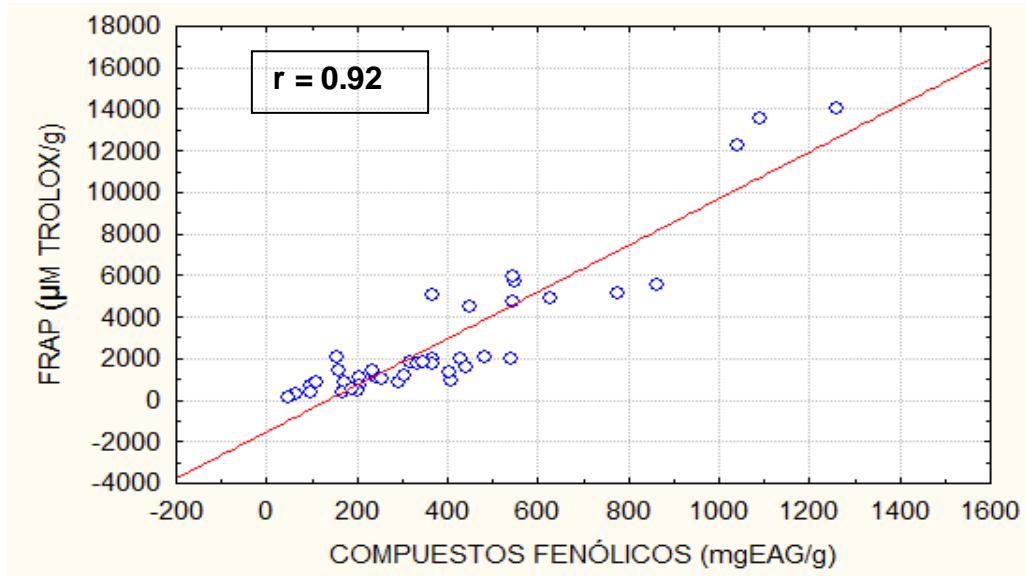
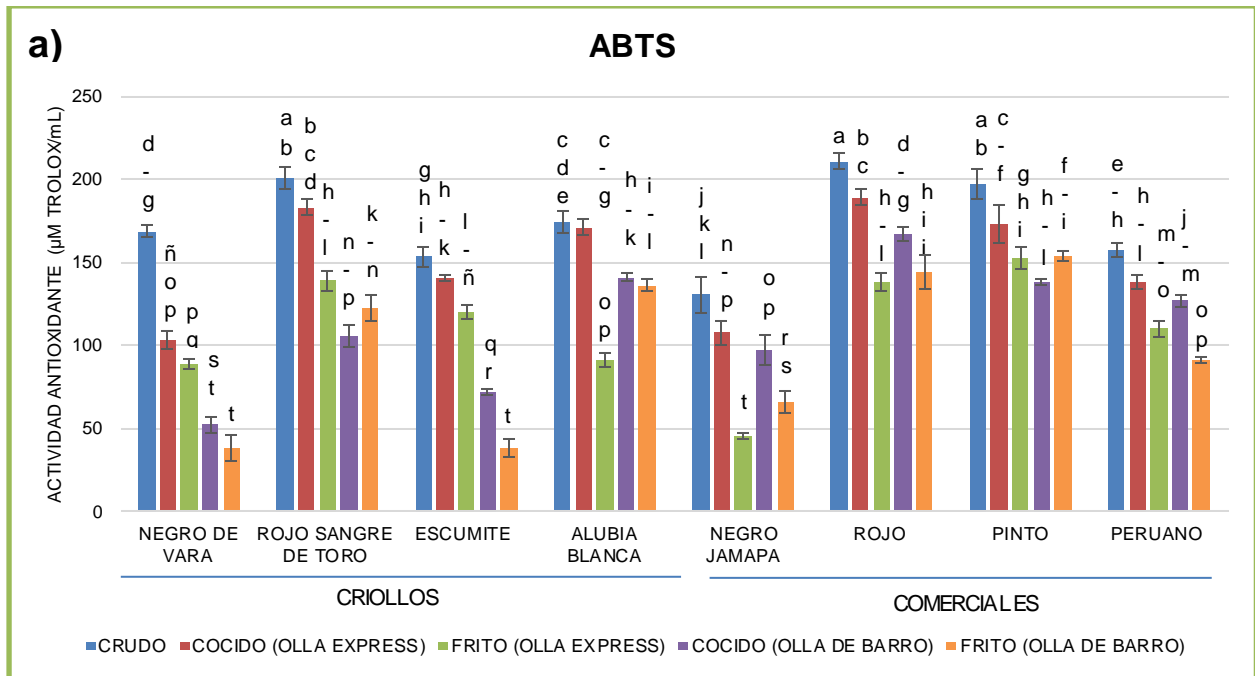


Figura 11. Actividad antioxidante de frijol por la técnica FRAP.

a) Actividad antioxidante según el método de cocción, b) correlación entre contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.



MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, $n=3$, barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

b)

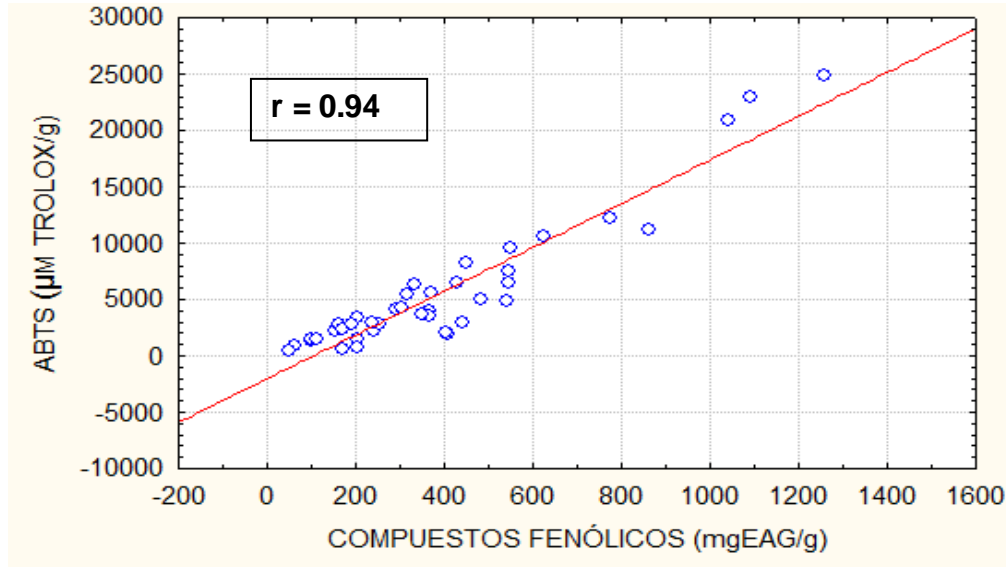


Figura 12. Actividad antioxidante de frijol por la técnica de ABTS.

a) Actividad antioxidante según el método de cocción, b) Correlación entre contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

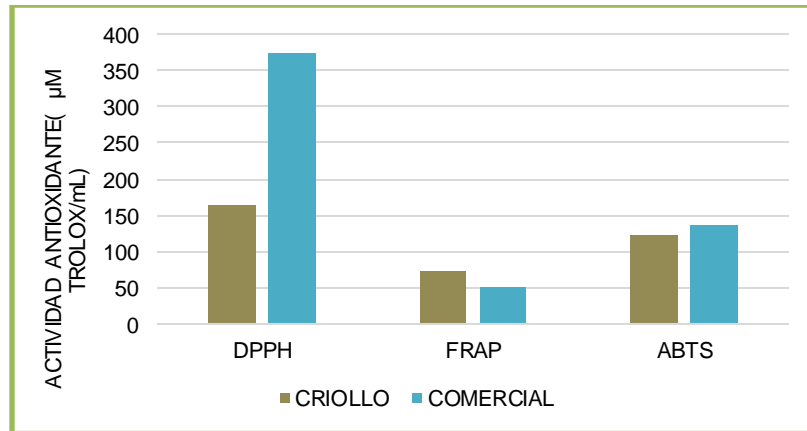


Figura 13. Actividad antioxidante *in vitro* de extracto normalizado de frijol criollo y comercial.

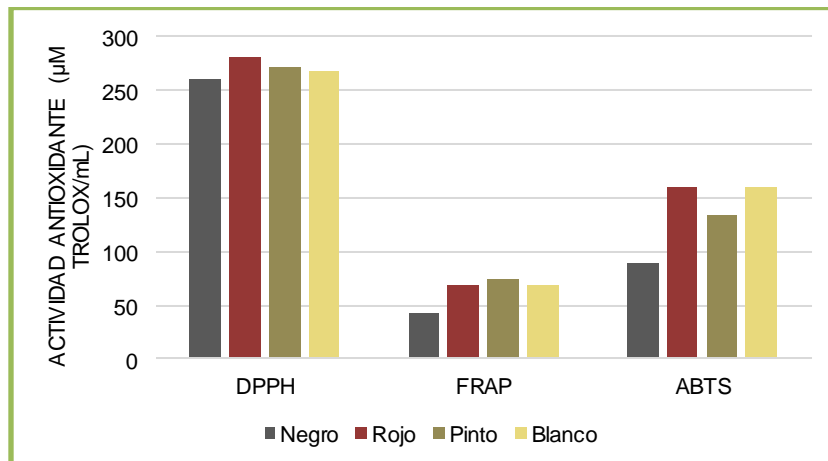


Figura 14. Actividad antioxidante *in vitro* de extracto normalizado de frijol según su color.

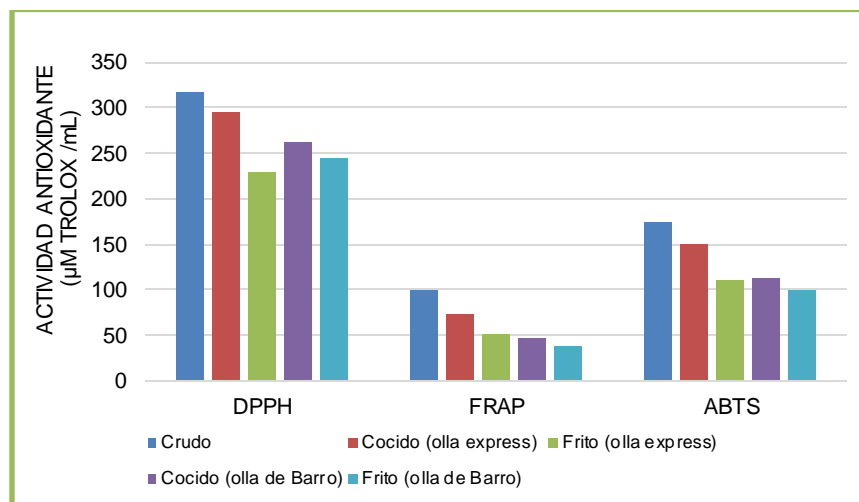


Figura 15. Actividad antioxidante *in vitro* de extracto normalizado de frijol según el método de cocción.

8.3.2 Actividad antioxidante *in vivo*

Cuando se quiere sugerir el consumo de un alimento rico en antioxidantes, es necesario ver sus efectos en un sistema biológico, por eso se desarrolló un método para ver la actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos fenólicos de frijol, para la cual se realizó un estudio de supervivencia en *C. elegans*, un nemátodo de muy fácil mantenimiento en el laboratorio y fácil de inducir a estrés oxidativo.

8.3.2.1 Estrés oxidativo con H_2O_2

Estandarización del método: Se realizó una curva de concentración-respuesta con H_2O_2 en concentraciones de 5 a 15 mM para determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) y el tiempo letal 50 (TL₅₀) de esta sustancia en *C. elegans*, para obtener estos datos se realizaron regresiones lineales donde la CL₅₀ calculada fue de 5.9 mM (Figura 16) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.92 y un intervalo de confianza (IC) de -9.296 ± 0.60 a una $\alpha = 0.025$, mientras que el TL₅₀ fue de 5.8 horas (Figura 17) con un $R^2 = 0.94$ y un IC de -10 ± 0.57 , es decir, se requiere de una concentración de 5.9 mM de H_2O_2 para que la mitad de la población muera y esa muerte se lleva a cabo en 5.8 horas.

Por otro lado, se buscó la manera de que el nemátodo absorbiera los compuestos fenólicos previo a someterlo al estrés oxidativo de tal manera que la actividad antioxidante correspondiera solo a los compuestos fenólicos absorbidos y no a los compuestos que se encontraran en el medio de cultivo, para esto se realizó una curva de concentración-respuesta a los extractos de frijol a concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos. El límite de tolerancia a compuestos fenólicos fue de 50 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ fue letal para *C. elegans* (Figura 18). El

TL₅₀ a la concentración límite de tolerancia (50 µg/mL de compuestos fenólicos) con un R²= 0.95 y un IC de -11.4 ± 0.44 fue de 5.4 horas (Figura 19).

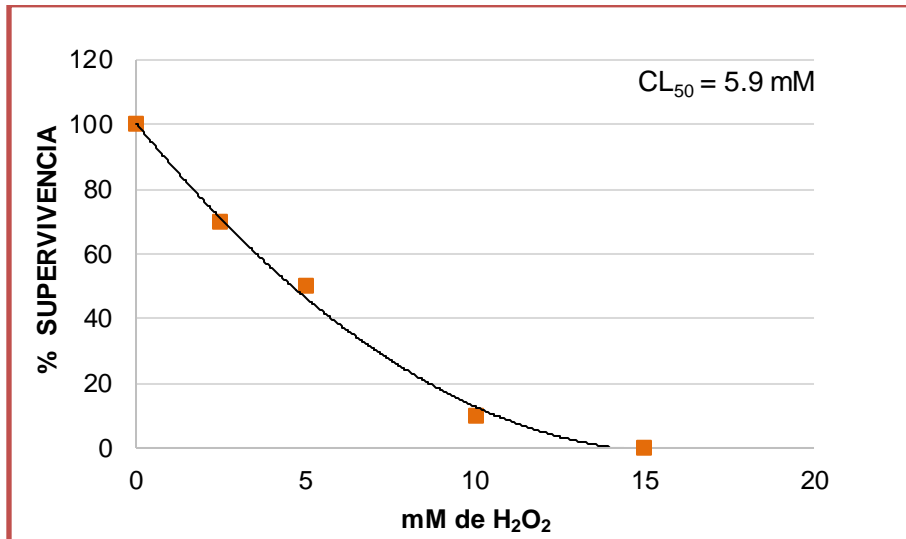


Figura 16. CL₅₀ de H₂O₂ en *C. elegans*.

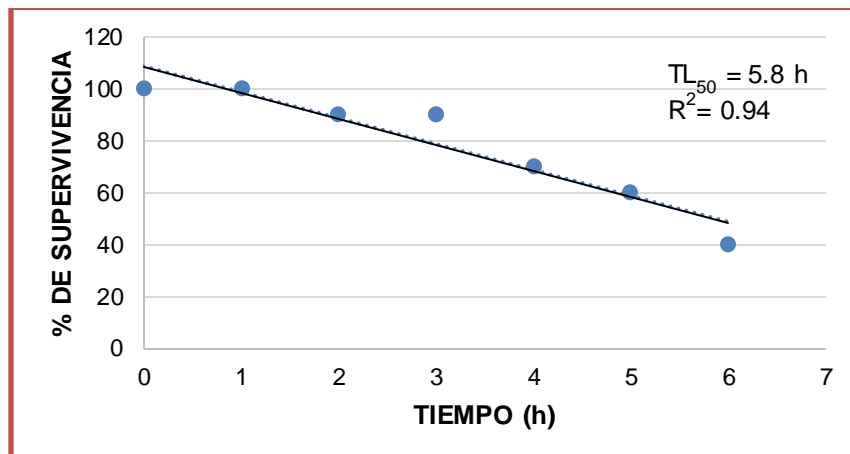


Figura 17. TL₅₀ en *C. elegans* a una concentración de 5 mM de H₂O₂.

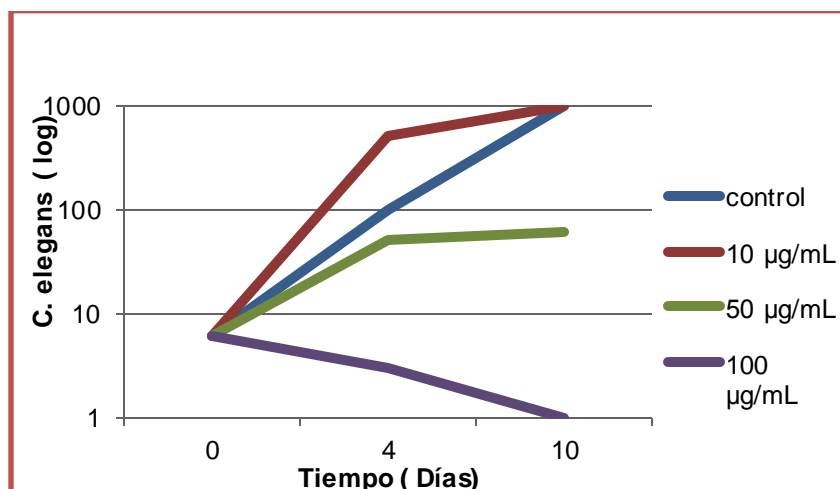


Figura 18. Concentraciones de compuestos fenólicos en *C. elegans*.

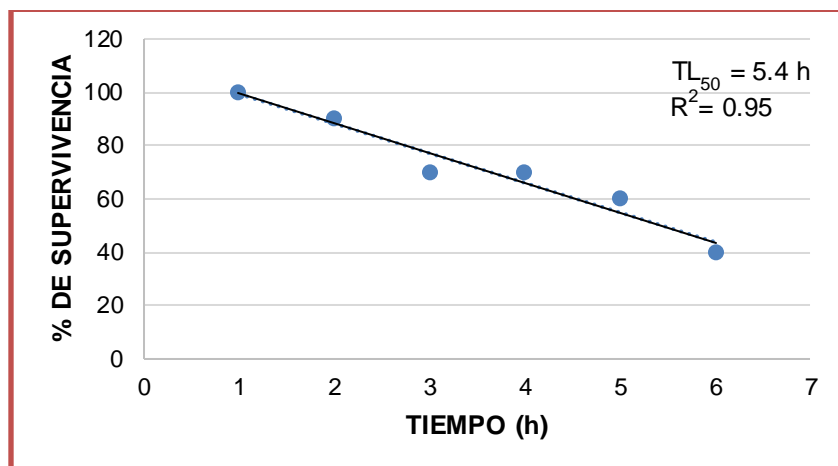


Figura 19. TL_{50} en *C. elegans* a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos.

Se realizó un ensayo general con todos los extractos de frijol en donde se observó que las semillas de frijol Negro de vara, Pinto, Escumite y Alubia blanca tuvieron mejor efecto antioxidante a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos, mientras que los frijoles Negro Jamapa, Peruano, Rojo y Rojo sangre de toro a esta concentración sensibilizaron a *C. elegans* antes de agregar el H_2O_2 observado en una muerte rápida de los nematodos mientras que a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos se vio el efecto protector ante un estrés oxidativo (Tabla 12). Por lo anterior se realizó un ensayo más exhaustivo con los extractos de frijol Negro Jamapa y Rojo a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos y los extractos de frijol Escumite y Pinto a 50 $\mu\text{g/mL}$ de compuestos fenólicos.

El extracto de semilla cruda y cocida de frijol Negro Jamapa, independientemente del método de cocción, tiene una actividad antioxidante sin ser diferente significativamente respecto al control, por el otro lado, el frijol Rojo que fue el cultivar con mejor resultado en las pruebas con los radicales DPPH^- y ABTS^+ no tuvo ningún efecto antioxidante *in vivo* inclusive con el extracto de semilla cruda, ya que se obtuvo una CL_{50} 2% menor que el control en caso de semilla cruda y hasta un 15% menos que el control en semilla cocida independientemente del método (Figura 20), es decir, se requirió una concentración de H_2O_2 inferior al control para causar la muerte de la mitad de la población.

El extracto de frijol Escumite crudo tuvo el mejor efecto protector ante el estrés oxidativo en *C. elegans* en comparación al resto de las semillas, con un incremento de un 32% en la CL_{50} con respecto al control y cuando esta semilla se sometió a cocción con el método moderno (frijol cocido y frito) se obtuvo una CL_{50} 17% superior respecto al control. No se observó diferencia significativa entre frijol cocido y frito. Con el método tradicional de cocción el aumento en la CL_{50} no fue significativo respecto al control que no fue tratado con compuestos fenólicos. El extracto de semilla cruda de frijol Pinto aumentó un 16.5% la CL_{50} con respecto al control y el extracto de semilla cocida y frita

independientemente del método utilizado, no tuvo actividad antioxidante en *C. elegans* ya que no se observaron aumentos significativos en la CL₅₀ respecto al control (Figura 21).

8.3.2.2 Estrés oxidativo con alta concentración de glucosa

Estandarización del método: Se realizó una curva de concentración-respuesta con glucosa a concentraciones de 40 mM (concentración reportada por Schlotterer y col., 2009) y 80 Mm y se observó que a esta última concentración se redujo el tiempo de vida de *C. elegans* respecto al control y se vio una disminución en el porcentaje de supervivencia desde el día 10 del ensayo (Figura 22) en comparación a la concentración de 40 mM, en donde la reducción en el porcentaje de supervivencia solo fue de un 10% en el día 15 del ensayo y disminuyó solo un 30% de la población el día 25.

Por otro lado, hubo un aumento de 5 días en el tiempo de vida de *C. elegans* en el medio de cultivo al que se le adicionó el extracto de frijol con respecto al control, sin embargo, este efecto no fue mayor al aumentar la concentración de compuestos fenólicos ya que no se observó ninguna diferencia entre las dos concentraciones evaluadas (10 µg/mL y 25 µg/mL de compuestos fenólicos) (Figura 23).

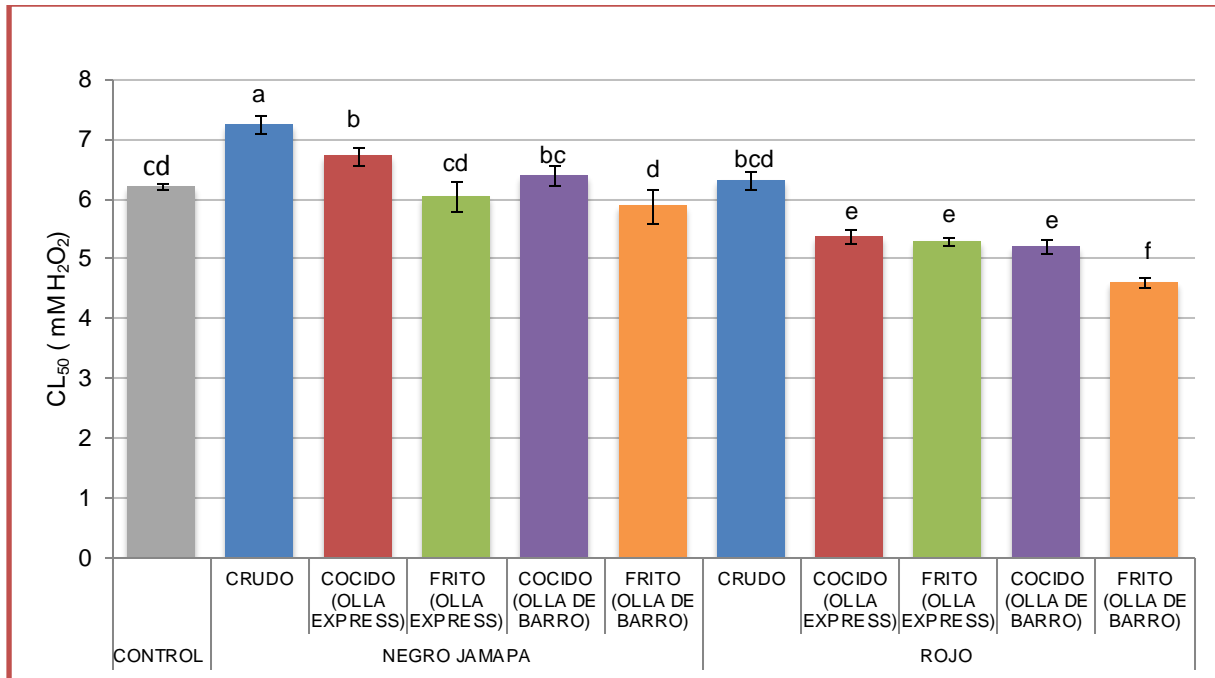
Tabla 12 Actividad antioxidante *in vivo* de frijol según su color y cocción.

FRIJOL	COCCIÓN	CL ₅₀ (mM de H ₂ O ₂)	
		*25 µg/mL	*50 µg/mL
CONTROL		6.2	6.2
NEGRO DE VARA	CRUDO	6.5	6.2
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.1	5.9
	FRITO (OLLA EXPRESS)	5.9	5.8
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	6.0	5.7
	FRITO (OLLA DE BARRO)	5.8	5.6
NEGRO JAMAPA	CRUDO	6.7	7.3
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.5	6.8
	FRITO (OLLA EXPRESS)	6.0	6.1
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	6.0	6.2
	FRITO (OLLA DE BARRO)	5.7	6.1
PINTO	CRUDO	7.2	6.8
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.7	6.7
	FRITO (OLLA EXPRESS)	6.0	5.8
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	5.6	5.8
	FRITO (OLLA DE BARRO)	6.5	5.7
ESCUMITE	CRUDO	8.1	7.7
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	7.2	7.0
	FRITO (OLLA EXPRESS)	7.2	6.8
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	6.6	6.6

	FRITO (OLLA DE BARRO)	6.2	5.9
ALUBIA BLANCA	CRUDO	6.8	6.4
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.4	6.3
	FRITO (OLLA EXPRESS)	6.1	5.8
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	5.5	5.5
	FRITO (OLLA DE BARRO)	5.2	5.4
PERUANO	CRUDO	6.3	7.1
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.2	6.5
	FRITO (OLLA EXPRESS)	6.1	6.2
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	6.0	6.4
	FRITO (OLLA DE BARRO)	5.7	5.9

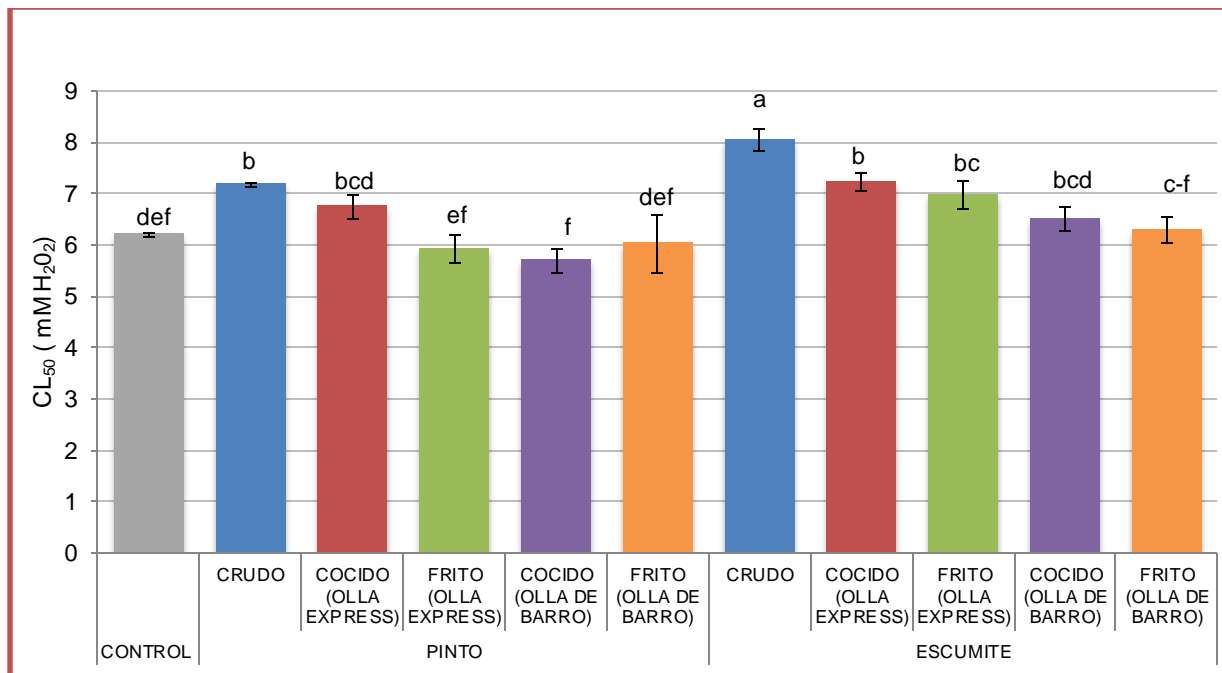
Tabla 13. Actividad antioxidante *in vivo* de frijol según su color y cocción (continuación)

FRIJOL	COCCIÓN	CL₅₀ (mM de H₂O₂)	
		*25 µg/mL	*50 µg/mL
CONTROL		6.2	6.2
ROJO SANGRE DE TORO	CRUDO	6.3	6.7
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	6.1	6.5
	FRITO (OLLA EXPRESS)	6.0	6.0
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	4.9	6.2
	FRITO (OLLA DE BARRO)	4.9	5.4
ROJO	CRUDO	6.0	6.2
	COCIDO (OLLA EXPRESS)	4.9	5.5
	FRITO (OLLA EXPRESS)	5.2	5.3
	COCIDO (OLLA DE BARRO)	4.6	5.2
	FRITO (OLLA DE BARRO)	4.3	4.6



MF ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ n=9; barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

Figura 20. CL₅₀ de frijol Negro Jamapa y Rojo a una concentración de 25 μ g/ml.



MF ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ n=9; barra=SD, letra diferente denota diferencia significativa

Figura 21. CL₅₀ de frijol Pinto y Escumite a una concentración de 50 μ g/ml de compuestos fenólicos.

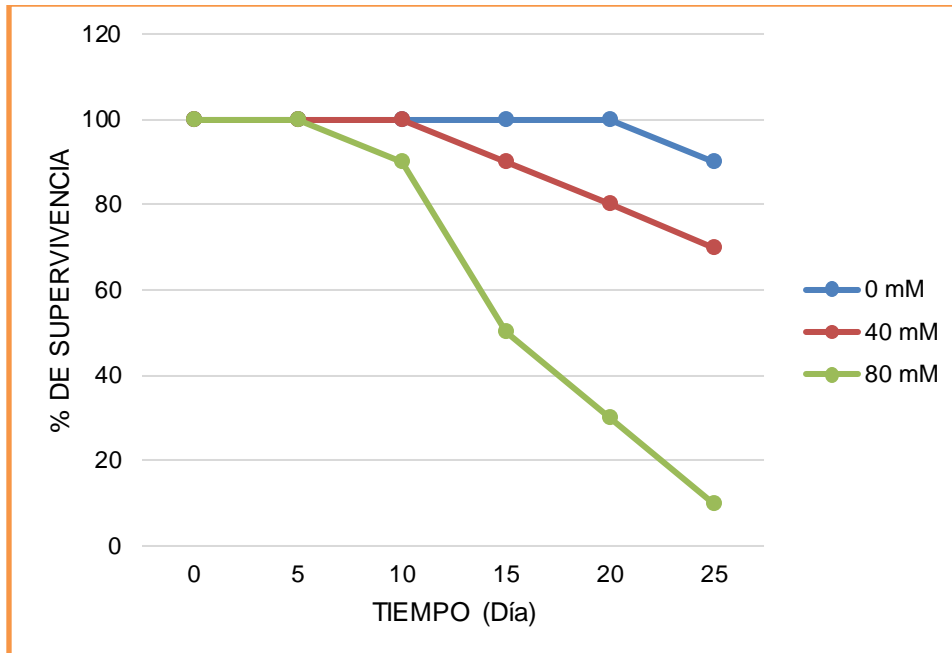


Figura 22. Curva concentración-respuesta con glucosa en *C. elegans*.

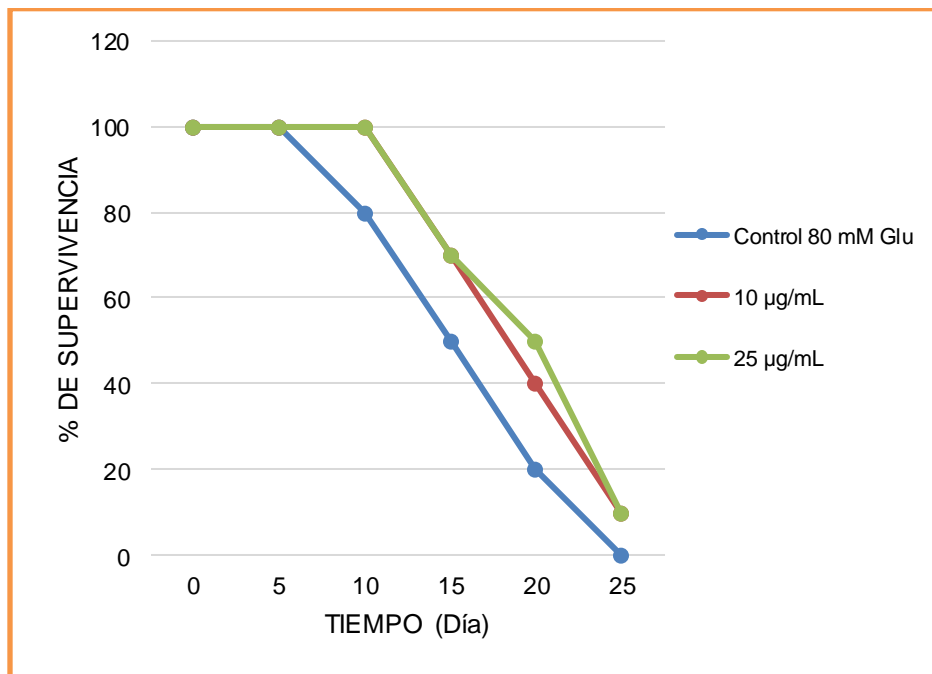


Figura 23. Supervivencia de *C. elegans* con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos en medio con glucosa.

Como se obtuvo el mejor resultado con extracto de frijol Escumite crudo en la prueba de estrés oxidativo con H_2O_2 , se quiso ver la actividad antioxidante de este frijol en un medio con una alta concentración de glucosa, el cual se ha reportado causa un desorden metabólico que conlleva una sobreproducción de ERO. Se colocaron en el medio de cultivo extractos de frijol crudo y frito (por ambos métodos de cocción) ya que se observó la mayor pérdida de actividad con el método de freído.

En condiciones normales el tiempo de vida máximo de *C. elegans* fue de 25 días y cuando se colocó el extracto de frijol Escumite crudo en el medio de cultivo se obtuvo un aumento del 10% en la supervivencia de *C. elegans* respecto al control desde el día 20 (Figura 24, líneas continuas). Cuando este nemátodo fue colocado en medio de cultivo con 80 mM de glucosa el tiempo de vida se redujo a 20 días, y la supervivencia en ese día disminuyó un 30% en comparación al medio control que no contenía glucosa (Figura 24).

Cuando se adicionó el extracto de frijol al medio de cultivo que contenía glucosa el aumento en la supervivencia a partir del día 20 fue de un 20% con extracto de semilla cruda y de un 10% con extracto de semilla frita con respecto al medio que solo contenía glucosa (Figura 24, líneas punteadas) y no hubo diferencias significativas entre los métodos de cocción utilizados previo al freído de la semilla.

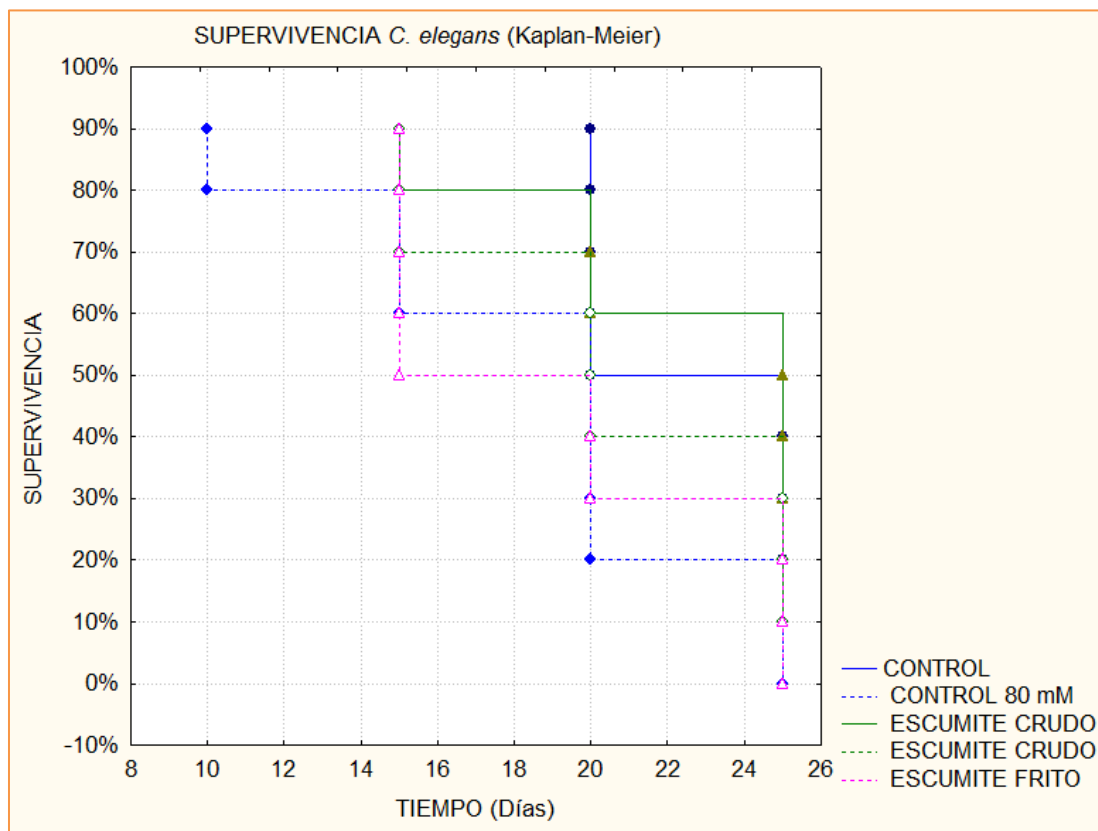


Figura 24. Supervivencia de *C. elegans* en estrés oxidativo causado por altas concentraciones de glucosa con extracto de frijol Escumite. (Línea continua: Medio sin glucosa; línea punteada: Medio con glucosa).

8.4 Análisis de componentes principales

Integrando los resultados obtenidos de la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* se realizó un análisis de componentes principales, una herramienta estadística que ayuda a reducir variables basado en un análisis de correlación entre los datos. Este análisis provee una representación de la información obtenida en dos ejes artificiales, en el eje horizontal la correlación que

existe entre los datos (63.8% de la varianza) y en el eje vertical la variabilidad entre los mismos (26.85% de la varianza) (Figura 25).

Como resultado de este análisis se pudo ver que la actividad antioxidante *in vitro* (DPPH, FRAP y ABTS) está correlacionada directamente con la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos (FOLIN) mientras que la actividad antioxidante *in vivo* (CL₅₀) no se correlaciona (Figura 25), con esto, se puede inferir que el eje horizontal representa principalmente la actividad antioxidante *in vitro* y el eje vertical la actividad antioxidante *in vivo*.

Al colocar los datos obtenidos de las semillas de frijol analizadas en los dos ejes formados se observó que las semillas crudas están muy dispersas y una notable variabilidad en el eje horizontal, lo cual indica que para la actividad antioxidante *in vitro* el contenido y perfil de compuestos fenólicos de cada semilla es de gran importancia mientras que el comportamiento de las semillas después de una cocción se uniformiza independientemente si se utiliza el método moderno o tradicional (Figura 26).

El frijol criollo Escumite tanto crudo como cocido se encuentran agrupados (Figura 26, números 1,9,17,25 y 33), los resultados de los extractos de semilla cocida de la manera moderna y después frita (Figura 26, números 9 y 17 respectivamente) se desplazan hacia arriba en el eje vertical respecto a la semilla cruda y se observa un pequeño cambio en el eje horizontal; los resultados de los extractos de semilla cocida de la manera tradicional y después frita (Figura 26, números 25 y 33 respectivamente) se encuentran de igual manera desplazados hacia arriba con respecto a los resultados observados con la semilla cruda y en este caso no se observó ningún cambio en el eje horizontal.

Caso contrario son los resultados observados con los extractos de frijol comercial Pinto, en donde se nota una diferencia grande entre la semilla cruda y aquella sometida a una cocción (Figura 26, números 2,10,18,26 y 34), en este caso se observa que el desplazamiento de los resultados entre frijol cocido por el método moderno y posteriormente freído (Figura 26, número 10 y 18 respectivamente) es en los dos ejes al igual que las semillas cocidas con el método tradicional y después fritas (Figura 26, número 26 y 34 respectivamente).

En lo referente al frijol Negro Jamapa los resultados del extracto de semilla cruda se encuentran muy cercanos al cruce de los dos ejes (Figura 26, número 4), es decir, su comportamiento no puede ser explicado por las variables artificiales creadas por el análisis; después de la cocción el desplazamiento entre semilla cocida por el método moderno y semilla frita (procedente del mismo método) es principalmente en el eje vertical (Figura 26, número 12 y 20 respectivamente) al igual que las semillas sometidas a cocción con el método tradicional y después fritas, aunque en este caso el desplazamiento es mínimo (Figura 26, número 28 y 36 respectivamente).

El extracto de semilla cruda de Alubia blanca se encuentra dentro del grupo formado por semillas cocidas, el desplazamiento de los extractos de semilla cocida y frita es hacia la derecha en el eje horizontal y hacia arriba en el eje vertical y en esta semilla el

desplazamiento entre semilla cocida y frita de un mismo método de cocción es muy poco y principalmente es en el eje vertical (Figura 26. Método moderno: Número 13 cocido y número 21 frito; Método tradicional: Número 29 cocido y número 37 frito)

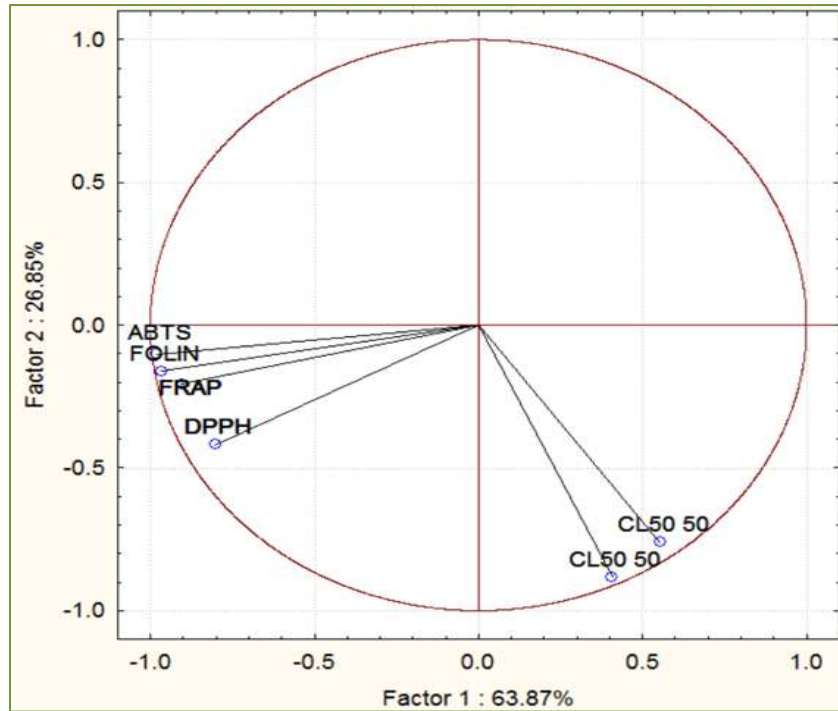


Figura 25. Análisis general de componentes principales.

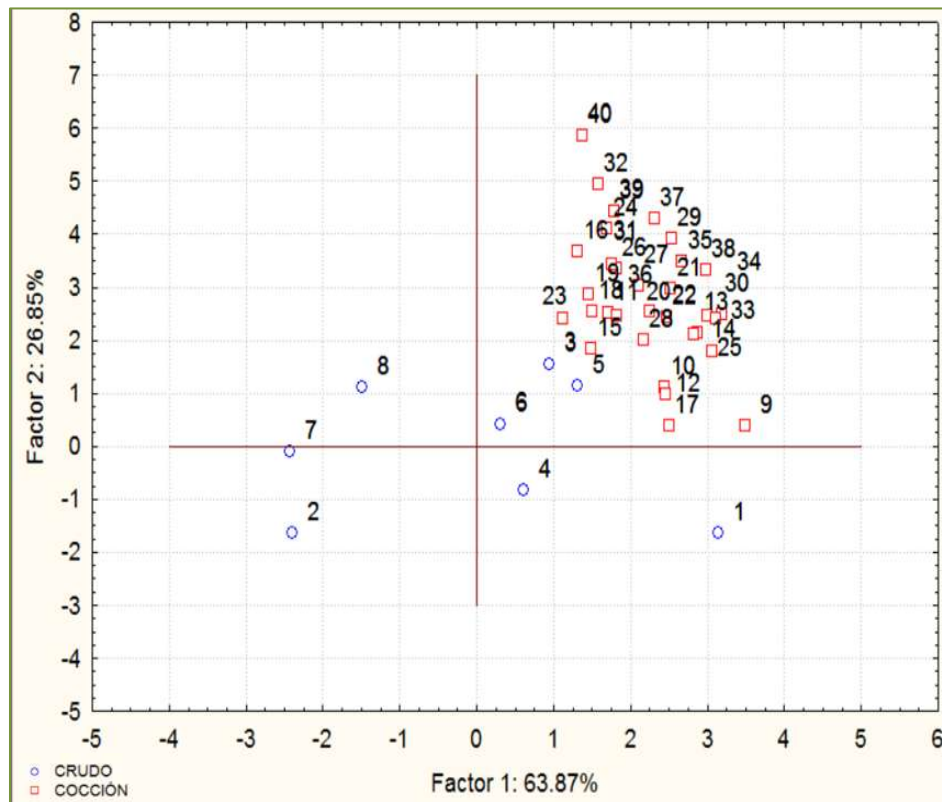


Figura 26. Análisis de componentes principales de frijol crudo y cocido.

Figura 27. Análisis de componentes principales de frijol crudo y cocido (continuación).

No	Cultivar y tratamiento	No	Cultivar y tratamiento	No	Cultivar y tratamiento	No	Cultivar y tratamiento
1	Escumite Crudo	11	Negro de vara Cocido (olla Express)	21	Alubia blanca Frita (olla Express)	31	Rojo sangre de toro Cocido olla de barro
2	Pinto Crudo	12	Negro Jamapa Cocido (olla Express)	22	Peruano Frito (olla Express)	32	Rojo Cocido olla de barro
3	Negro de vara Crudo	13	Alubia blanca Cocida (olla Express)	23	Rojo sangre de toro Frito (olla Express)	33	Escumite Frito (olla de barro)
4	Negro Jamapa Crudo	14	Peruano Cocido (olla Express)	24	Rojo Frito (olla Express)	34	Pinto Frito (olla de barro)
5	Alubia blanca Cruda	15	Rojo sangre de toro Cocido (olla Express)	25	Escumite Cocido olla de barro	35	Negro de vara Frito (olla de barro)
6	Peruano Crudo	16	Rojo Cocido (olla Express)	26	Pinto Cocido olla de barro	36	Negro Jamapa Frito (olla de barro)
7	Rojo sangre de toro Crudo	17	Escumite Frito (olla Express)	27	Negro de vara Cocido olla de barro	37	Alubia blanca Frito (olla de barro)
8	Rojo Crudo	18	Pinto Frito (olla Express)	28	Negro Jamapa Cocido olla de barro	38	Peruano Frito (olla de barro)
9	Escumite Cocido (olla Express)	19	Negro de vara Frito (olla Express)	29	Alubia blanca Cocido olla de barro	39	Rojo sangre de toro Frito (olla de barro)
10	Pinto Cocido (olla Express)	20	Negro Jamapa Frito (olla Express)	30	Peruano Cocido olla de barro	40	Rojo Frito (olla de barro)

8.5 Determinación del perfil de compuestos por HPLC

En base al análisis de componentes principales realizado se seleccionaron semillas de frijol Pinto, Escumite, Negro Jamapa y la Alubia blanca para comparar el perfil de compuestos entre ellas y la manera en que estos cambian según el método de cocción.

El frijol Pinto fue el cultivar que tuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos en semilla cruda pero pierde gran cantidad de esos compuestos y de actividad antioxidante después de la cocción; el frijol Escumite tuvo el menor contenido de compuestos fenólicos en semilla cruda, sin embargo, después de la cocción no hubo una diferencia significativa entre métodos de cocción y fue el extracto con mejor actividad antioxidante *in vitro* (método FRAP) e *in vivo*; la Alubia blanca al ser frita (cocción en olla express) presenta mayor contenido de compuestos fenólicos respecto a la semilla cocida, por lo cual fue interesante conocer el perfil de compuestos de los extractos de frijol sometidos a estos dos tratamientos de cocción y el frijol Negro Jamapa fue de las semillas con menor contenido de compuestos fenólicos en semilla cruda, después de la cocción si hubo diferencias significativas en la pérdida de estos compuestos entre métodos de cocción y tuvo muy poca actividad antioxidante.

Esta identificación de compuestos se realizó por medio de HPLC de acuerdo al tiempo de retención de los estándares (Anexos, Tabla E1) y los resultados obtenidos se expresaron en abundancia relativa (%) puesto que no todos los compuestos contenidos en los extractos se pudieron identificar y se cometerían errores de cuantificación con el método de estándar externo.

En todos los cultivares analizados se encontraron los ácidos Quínico, Ferúlico, p-Cumárico, Cafeico y dos compuestos no identificados con TR de 5.3 y 8.7 min., todos estos compuestos encontrados se conservan después de la cocción independientemente del método utilizado.

En la Alubia blanca cruda se encontraron 28 compuestos (Anexos, Figura E1) y se encontró que esta semilla contiene un 12% de ácido Quínico, 2% de ácido Ferúlico y menos de 1% de los ácidos p-Cumárico y Cafeico (Anexos, Tabla E2). Después de la cocción los compuestos con TR inferiores a los 3 min., entre ellos el ácido Quínico, incrementan su abundancia relativa mientras que los compuestos con TR de 22 y 30 min se pierden totalmente por cualquier método de cocción.

El compuesto no identificado con un TR de 23.4 min se pierde solo cuando la semilla es cocida en olla de barro (Anexos, Tabla E2).

En el cultivar comercial Negro Jamapa crudo se encontraron 20 compuestos (Anexos, Figura E6), donde hay un 61% (en abundancia relativa) de un compuesto con TR de 5.2 min. (Anexos, Tabla E3). El ácido Quínico incrementa su abundancia relativa cuando se somete la semilla a una cocción independientemente del método y disminuye después del freído. El ácido p-Cumárico se pierde cuando la semilla es frita solo en el caso de cocción en olla de barro mientras que la pérdida del ácido Ferúlico sucede al cocer la semilla en olla express.

De igual manera los compuestos con TR de 20.8 min y superiores a los 30 min se pierden totalmente después de la cocción. En este cultivar se encontró un compuesto con TR de 26.1 min solo en la semilla frita con abundancias relativas de 0.23% (cocción en olla express) y 0.14% (cocción en olla de barro) (Anexos, Tabla E3).

El frijol Escumite crudo contiene 21 compuestos (Anexos, Figura E11), de los cuales el compuesto con TR de 5 min tuvo una abundancia relativa de 45%. De los cultivares analizados, el frijol Escumite crudo tiene el mayor contenido de ácido Quínico (31.6 %) además de identificarse en este extracto el ácido Gálico. Cuando este cultivar se somete a cocción el compuesto con TR de 2.11 min aumenta de manera considerable su abundancia relativa a lo encontrado en la semilla cruda. El ácido Quínico aumenta su abundancia relativa después del freído, hasta un 54% cuando la cocción se realizó de la manera tradicional (Anexos, Tabla E4), lo mismo ocurre con el ácido Cafeico, sin embargo, en este caso no se ve una correlación clara hacia algún método de cocción en particular. El ácido Gálico disminuye cuando el frijol esta cocido e incrementa su abundancia casi al doble al estar frito sin una diferencia significativa entre métodos de cocción. El ácido p-Cumárico aumenta su abundancia relativa con la cocción, permaneciendo constante con el método en olla express y aumentando considerablemente después de freírlo. Al contrario de esos ácidos fenólicos, el ácido Ferúlico en esta semilla se pierde totalmente después de la cocción (Anexos, Tabla E4).

En el extracto de frijol crudo del cultivar Pinto se encontraron 31 compuestos de los cuales el mayoritario (35% de abundancia relativa) tiene un TR de 2.1 min. (Anexos, Figura E16). Se identificaron los ácidos Quínico en mayor proporción, Gálico, Clorogénico, p-Cumárico y Ferúlico. En este caso el ácido Quínico aumenta su

abundancia relativa al estar la semilla cocida y disminuye después del freído por los dos métodos de cocción. El ácido Gálico se pierde con el método en olla express y al estar frito procedente de cocción en olla de barro mientras que en el caso del ácido Ferúlico, este se conserva independientemente del método de cocción.

El compuesto con TR de 24.3 min solo se encontró después de la cocción en olla express y aumentó con el freído, el compuesto con TR de 24.5 min solo se presenta en los frijoles cocidos, perdiéndose cuando la semilla se fríe (Anexos, Tabla E5). Los compuestos con TR de 22 min y superiores a los 29.7 min desaparecen por completo con cualquier método de cocción.

Los casos más interesantes en cuanto a contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vivo* fueron con las semillas pintas, esto es más claro en el análisis de componentes principales en donde los resultados obtenidos con el frijol Escumite (semilla criolla) está muy cercanos en los dos ejes formados y el frijol Pinto (semilla comercial) tiene una gran distancia entre semilla cruda y cocida (Figura 26). En este análisis los tratamientos con mayor distancia de la semilla cruda en los ejes horizontal y vertical, es decir, tanto en actividad *in vitro* como *in vivo* son las semillas fritas (cocción en olla de barro) por lo cual se compararon los perfiles de compuestos encontrados de estas dos semillas y estos dos tratamientos respecto a la semilla cruda. Se pudo observar que en las dos semillas está presente el ácido Gálico, sin embargo, después de la cocción se pierde por completo en ambos casos al contrario de los demás ácidos fenólicos encontrados; el frijol Pinto crudo tiene 13 compuestos más que el frijol Escumite, en cambio, este frijol tiene tres compuestos que no aparecen en la semilla de frijol Pinto.

El compuesto con TR de 2.1 min se encuentra con mayor abundancia en la semilla cruda de frijol Pinto e incrementa en los dos casos después del freído de la semilla, este aumento en la abundancia relativa es mayor en el caso del frijol Escumite (Tabla 8); el compuesto con TR de 2.6 min está en mayor abundancia en el frijol Pinto crudo en comparación con el frijol Escumite, en este frijol desaparece por completo en semilla frita, mientras que en el frijol Pinto solo disminuye la abundancia relativa; el compuesto con TR de 5.3 min. que se encontró en los dos extractos, en el frijol Escumite después de la cocción la pérdida es de más del 50% y en el frijol Pinto aumenta un poco la abundancia relativa en comparación a la semilla cruda. Los compuestos con TR superior a los 26 minutos desaparecen por completo en ambas semillas después del freído.

Tabla 14. Comparación de perfiles de compuestos de frijol Escumite y Pinto.

Señal	TR (min)	ESCUMITE		PINTO		COMPUESTO
		ABUNDANCIA RELATIVA (%)				
		Crudo	*Frito	Crudo	*Frito	
1	2.04	31.6	55.5	14.5	27.4	Ácido Quínico
2	2.12	0.1	23.8	35.4	35.7	
3	2.65	6.0	0.0	8.6	7.4	
4	4.25	1.9	0.0	2.0	0.0	Ácido Gálico
5	5.31	49.0	12.2	11.6	14.7	
6	8.76	3.7	1.0	8.8	8.0	
7	21.41			1.0	0.0	
8	22.46	1.0	0.8	0.3	0.0	
9	22.87	0.1	0.0	0.5	0.0	
10	23.11			0.4	0.2	
11	23.29	0.2	0.0	0.3	0.0	
12	23.60	0.5	0.6	0.7	0.4	Ácido Clorogénico
13	24.00	0.7	0.9	0.4	0.3	Ácido Cafeico
14	24.14			0.9	0.4	
15	24.31			0.8	0.0	
16	24.49	0.7	1.1	2.2	0.0	
17	24.62	0.5	0.0			
18	24.84	0.4	0.7	0.4	0.4	
19	25.00	1.0	0.7	0.5	0.7	
20	25.19	0.9	1.0	1.0	0.8	
21	25.27			1.4	0.9	
22	25.59	0.3	1.1	1.8	0.3	Ácido p-Cumárico
23	25.72			0.6	0.3	
24	25.92	0.6	0.0	0.7	1.1	
25	26.16	0.3	0.5	2.4	0.3	
26	26.34	0.2	0.0	0.4	0.6	Ácido Ferúlico
27	26.85			1.2	0.0	
28	29.75			0.1	0.0	
29	30.63			0.1	0.0	
30	31.16			0.2	0.0	
31	31.91	0.2	0.0			
32	32.39	0.2	0.0			

33	33.19			0.4	0.0	
34	35.08			0.3	0.0	

* Cocción en olla de barro

9. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como objetivo comparar el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de un extracto metanólico de frijol, ya que se sabe que es un alimento funcional que además de tener un valor nutritivo su consumo favorece la prevención de algunas enfermedades crónico degenerativas (Guzmán y col., 2002; Hangen y Bennink, 2002 Reynoso y col, 2007), para esto se escogieron semillas de frijol criollo y comercial de 4 colores diferentes que representaron la variabilidad en el consumo de esta leguminosa en México. También se investigó el efecto que tienen diferentes métodos de cocción utilizados sobre estos factores y se propuso una técnica para evaluar la capacidad antioxidante *in vivo* de extractos de frijol en el nemátodo *C. elegans* sometido a estrés oxidativo.

En lo referente a la cuantificación de compuestos fenólicos totales de semilla de frijol crudo, los resultados obtenidos no tuvieron una relación entre el color de la semilla y el contenido de compuestos fenólicos, es decir, los frijoles negros (Negro de vara y Negro Jamapa) no mostraron un mayor contenido que aquellas semillas de color claro como los pintos (Figura 6). Esta relación está ampliamente reportada y muestra que las semillas de frijol de color oscuro poseen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que las semillas de colores claros como los rosados, pintos y alubias, esto se debe a que en la testa de la semilla se encuentran gran cantidad de taninos y antocianinas, polifenoles que dan la coloración oscura (Heimler y col., 2005; Díaz y col. 2006; Luthria y Pastor, 2006; Gálvez y col., 2009; Martínez, 2013).

En general los cultivares comerciales utilizados en este estudio tuvieron un mayor contenido de compuestos fenólicos comparados con las semillas criollas, con excepción de los frijoles con testa roja en donde no hubo una diferencia significativa entre la semilla criolla y la comercial. Guzmán y col. (2002) realizaron una comparación similar en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) crudo y reportaron un valor de 3.29 mg de equivalentes de Catequina por gramo (mgEC/g) de semilla comercial y 3.10 mgEC/g en semilla criolla, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación sobre semillas comerciales y criollas.

Esta relación entre color de la semilla y contenido de compuestos fenólicos fue evidente al tomar los datos de la cuantificación de extractos de frijol crudo, cocido y frito independientemente del método de cocción utilizado, en donde el contenido de compuestos fenólicos totales fue en orden decreciente frijoles negros > rojos > pintos > blancos (Figura 8), lo cual indica que el frijol de color negro tiene un bajo contenido de compuestos fenólicos en semilla cruda, pero esos compuestos son muy estables a la cocción mientras que los frijoles claros, en especial el frijol Pinto, tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos en semilla cruda sin embargo sus compuestos son muy termosensibles y se pierde gran cantidad de ese contenido en el proceso de cocción.

Se encontró un mayor contenido de compuestos fenólicos en los cultivares comerciales independientemente si la semilla estaba cruda, cocida o frita (Figura 7), esto puede ser debido a la modificación genética para el mejoramiento de este tipo de semillas sobretodo en aspectos como la resistencia a plagas, crecimiento uniforme y rápido de la planta, mayor rendimiento y uniformidad de la semilla, ya que los compuestos fenólicos intervienen en la defensa de la planta contra patógenos y protección a radiación UV (Guzmán y col., 2009).

Luthria y Pastor (2006) cuantificaron los fenoles totales de 15 cultivares comerciales de frijol común crudo y reportaron un intervalo de 0.28 a 0.36 mgEAG/g para frijoles Pintos, de 0.20 a 0.27 mgEAG/g para frijoles rojos y un valor de 0.19 mgEAG/g en Alubia, resultados por debajo de los obtenidos en este estudio, pero con el mismo orden de contenido de compuestos fenólicos pintos > rojos > blancos. En este estudio, además, se realizó una caracterización del extracto de frijol por medio de HPLC y se encontraron los ácidos fenólicos p-Cumárico, Ferúlico y Sinápico en los 15 cultivares.

En los extractos de frijol seleccionados para obtener el perfil de compuestos (Alubia blanca, Negro Jamapa, Pinto y Escumite) se encontraron los ácidos Quínico, Cafeico, p-Cumárico, Ferúlico, lo cual concuerda con el estudio de Luthria y Pastor (2006), además de dos compuestos no identificados con TR de 5.31 y 8.76 min. Se encontró, también, ácido Clorogénico en Alubia blanca y frijol Pinto. Debido a que no se contaba con ácido Sinápico como estándar no se pudo realizar la identificación del mismo, sin embargo, existe la posibilidad de que este ácido fenólico se encuentre contenido en los extractos analizados.

Se observó una pérdida, en todos los casos, de los compuestos con TR de 30 minutos en adelante, que por las condiciones de elusión de los solventes en combinación con la columna no polar que se utilizó para la cromatografía, se puede inferir que se perdieron compuestos de naturaleza hidrofóbica.

En 2012 se identificaron por cromatografía líquida con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD) los mismos ácidos fenólicos libres y sus conjugados en el extracto metanólico de frijol negro, señalando al ácido Ferúlico como el componente mayoritario en los cotiledones de la semilla (Mújica y col., 2012), contrario a lo encontrado en este estudio donde el ácido Ferúlico tuvo una abundancia de 0.2 a 0.6 % dependiendo de la semilla de frijol analizada. Los diferentes resultados entre estudios, de acuerdo con Luthria y Pastor (2006), pueden ser por la variación en el genotipo, prácticas agronómicas, madurez y condiciones de almacenamiento de cada semilla.

En lo referente a la cocción, en las semillas sometidas a remojo previo, se observó un aumento en el volumen del grano y una textura blanda que aquellas cocidas sin remojo. En los dos métodos de cocción se observó que los caldos tenían colores oscuros, esto es porque durante el procesamiento de granos como el frijol, algunos pigmentos naturales como los flavonoides o taninos hidrosolubles se pierden, en especial en semillas de testa oscura.

En un análisis realizado del caldo de frijol se observó que contiene en promedio 6.96% de carbohidratos y 2.1% de proteínas, sin embargo, la concentración de compuestos

fenólicos no es significativa por lo cual la mayor parte de estos compuestos se retiene en la semilla y son degradados en el proceso de cocción (Martínez, 2013). En el método de cocción moderno las semillas presentaron una textura más blanda y fue más fácil la realización de la pasta para la extracción metanólica además de presentar un color intenso en comparación a aquellas sometidas al método tradicional de cocción. El agua hierve a 99°C a nivel del mar (14 psi); la olla express trabaja a 15 psi, a esta presión la temperatura del agua es de aproximadamente 121°C por lo cual se aplica una mayor temperatura ocasionando una cocción más rápida, menor pérdida de agua por evaporación y una consistencia más homogénea de la semilla.

Después de una cocción no se pierden por completo los compuestos fenólicos en las semillas de frijol analizadas. El contenido de compuestos fenólicos varió entre los métodos de cocción y hubo mayor contenido en casi todos los cultivares cocidos en olla express a excepción del frijol Escumite y Negro Jamapa, que no hubo diferencia significativa entre los métodos de cocción (Figura 7), en el caso del frijol Escumite la pérdida de compuestos fenólicos fue de aproximadamente un 50% respecto a su valor en semilla cruda independientemente del método de cocción utilizado, esto se pudo observar en el análisis de componentes principales (Figura 26), donde los extractos de esta semilla de frijol tanto cruda como cocida y frita, se encuentran en el mismo grupo. Se pudo comprobar en el perfil de compuestos obtenido por HPLC donde esta semilla perdió solo 4 compuestos después de la cocción y 7 compuestos en el extracto de semilla frita (Anexos, Tabla E4).

La pérdida de manera diferencial se encuentra relacionada con la temperatura y el tiempo de cada uno de los métodos utilizados, por lo que hubo una mayor pérdida de compuestos fenólicos donde el tiempo de cocción fue prolongado. Se sabe que un tratamiento térmico prolongado, incluso a una temperatura más baja, hace disminuir el valor nutritivo de la proteína, ya que destruye aminoácidos esenciales como lisina y cisteína (Serrano y Goñi, 2004). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Martínez (2013) donde se muestra que hay un mayor contenido de compuestos fenólicos en granos sometidos a cocción en olla express en cultivares Bayo, Flor de Mayo, Negro Jamapa, Mayocoba y Pinto, en comparación a los sometidos a cocción en olla de barro. Granito y col. (2007) compararon el contenido de compuestos fenólicos en *P. lunatus* crudo, cocido de la manera tradicional y deshidratado. En el estudio se ve una mayor pérdida de taninos con el método tradicional debido al largo periodo del proceso y una posible lixiviación de los taninos en la cocción.

Gálvez y col. (2009) mencionan en su estudio que el acto de retirar el agua de cocción y de remojo previo es la mayor causa en la pérdida de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y antocianinas) en frijol negro y pinto consumidos en Brasil.

Los valores de compuestos fenólicos en semilla de frijol cocida en olla express variaron desde 0.46 mgEAG/g para la Alubia blanca hasta 1.44 mgEAG/g para el cultivar Negro de vara, mientras que en olla de barro el frijol Peruano fue el cultivar con menor contenido (0.19 mgEAG/g) y el frijol Negro de vara fue el más alto (1.22 mgEAG/g). Un estudio en Brasil reporta valores de 0.010 mgEC/g para frijol blanco hasta 0.022 mgEC/g para frijol negro después de una cocción a 121° C y 15 lb de presión, valores

inferiores a los reportados en este trabajo (Ramírez y col., 2008) lo cual resalta el gran aporte de compuestos con beneficios a la salud del germoplasma mexicano.

El cultivar con mayor pérdida de compuestos fenólicos fue el Peruano con una reducción del 78% en olla express y un 92% cocido en olla de barro sus compuestos en agua y ser termosensibles, mientras que el frijol con menor pérdida fue el Negro de vara con solo un 23 % menos cocido en olla express y un 35% cuando fue cocido de la manera tradicional. Esto indica que los compuestos contenidos en ese cultivar son muy estables al calor y resistentes a la degradación. Helbig y col. (2003) reportan una pérdida del 86% en el contenido de taninos en *P. vulgaris* L. cv Carioca al cocerse a alta presión y sin remojo, los autores explican que la disminución es debido a la difusión de estos compuestos en el agua de cocción o por la formación de complejos insolubles entre taninos y proteínas, los cuales no se pueden identificar por métodos colorimétricos.

El frijol Pinto, que fue el de mayor contenido de fenoles en su estado crudo, después de la cocción perdió un 75% independientemente del método, esta pérdida de compuestos fenólicos se vio reflejada en el análisis de componentes principales (Figura 26) y al obtener el perfil de compuestos por HPLC, en donde se perdieron 8 y 10 compuestos con frijol cocido por el método moderno y tradicional respectivamente y hasta 13 compuestos con extracto de frijol frito (Anexos, Tabla E5).

En el perfil obtenido por HPLC se ve un incremento en la abundancia relativa del ácido Quínico y del compuesto no identificado con TR de 5 min para la Alubia blanca, frijol Negro Jampa y en el frijol Pinto solo cuando se encuentra frito (Anexos, Tabla E5), en el caso de lo observado con este último, ya había sido reportado anteriormente con frijol Negro 8025 y Negro Tacana con un aumento del 2.5% y 13% respectivamente en el contenido de compuestos fenólicos respecto a su valor cocido, los autores atribuyen el incremento a procesos de polimerización de algunos taninos en el proceso de freído (Almanza y col, 2008).

En los ensayos de actividad antioxidante *in vitro* de extractos normalizados de frijol crudo, se tuvo la mejor actividad en el frijol Rojo ante los radicales DPPH⁻ y ABTS⁺, mientras que en el ensayo FRAP la mayor actividad se obtuvo con el extracto de frijol Escumite, lo cual sugiere que el frijol Rojo posee compuestos ideales para la neutralización de radicales libres principalmente fenoles de estructura simple como lo son los ácidos fenólicos capaces de entrar al centro activo del radical DPPH⁻ y fenoles complejos como taninos y antocianinas capaces de neutralizar el radical ABTS⁺, mientras que el frijol Escumite posee compuestos que además de neutralizar radicales podrían intervenir en procesos REDOX dentro de la célula.

Al estar los extractos de frijol a una misma concentración, se observó que la potencia de acción incrementa o disminuye dependiendo de cada cultivar o especie de frijol, relacionado con su perfil de compuestos, esto lo reporta Okawa y col. (2001), quienes mencionan que cuando se evalúa la capacidad de neutralización de radicales libres como DPPH⁻ y ABTS⁺, no solo es importante el contenido de compuestos fenólicos sino la posición del grupo hidroxilo de sus compuestos.

Se ha reportado que en el frijol, las antocianinas y los taninos son los responsables de la actividad antioxidante *in vitro*, por tener sustituciones 3',4'orto-dihidroxi en el anillo B de su estructura; otra característica que les aporta una buena actividad antioxidante son las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7 (Figura 27) (Bressani y col., 1990; Ramírez y col., 2008).

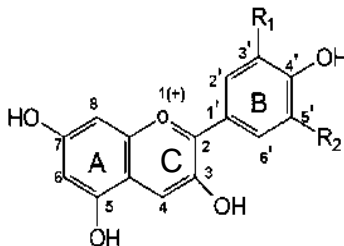


Figura 28. Estructura de antocianina.

Esta actividad no se pierde absolutamente después de la cocción de la semilla puesto que todavía están presentes compuestos fenólicos, sin embargo, si se afecta diferencialmente según el método utilizado, observándose una menor pérdida de la actividad antioxidante mediante el método de cocción en olla express. El cultivar con mayor pérdida de actividad fue el frijol Rojo, un frijol comercial, con un 58% cocido y 77% frito en el ensayo FRAP (Figura 11, panel a) lo cual demuestra que en la semilla cruda se encuentran compuestos con gran actividad antioxidante pero muy susceptibles a la degradación cuando son sometidos a cocción.

En el ensayo con el radical DPPH[·] se tuvo una mayor actividad antioxidante, expresada en μ MTROLOX/mL, con las semillas comerciales independientemente si se encontraban crudas o cocidas en comparación con las semillas criollas, por las otras dos técnicas no hubo diferencia entre tipo de semilla (Figura 13). Esto indica que las semillas comerciales de frijol analizadas tienen compuestos sencillos, como ácidos fenólicos, que fácilmente entran al sitio activo del radical y lo pueden neutralizar y que ambos tipos de semillas, criollas y comerciales, tienen compuestos complejos o polifenoles con capacidad de neutralizar radicales como el ABTS^{·+}, sin embargo, este radical es artificial y no refleja de manera adecuada la situación que se presenta en condiciones *in vivo*.

Si se comparan los extractos normalizados de frijol según su color, se puede observar que no hay diferencias entre los cuatro colores analizados en este estudio por las técnicas DPPH[·] y FRAP lo cual sugiere que la capacidad antioxidante depende de la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentren presentes en el extracto, en el ensayo con el radical ABTS^{·+} se notan ligeras diferencias entre colores, donde hay una mayor actividad antioxidante con los frijoles de color rojo y blanco (Figura 14) y no se ven diferencias entre métodos de cocción (Figura 15).

Con los resultados de la actividad antioxidante *in vitro* ajustados a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en cada extracto, se observó una correlación directa entre la concentración y la actividad biológica, 0.89 para DPPH[·] (Figura 10, panel b), 0.92 para FRAP (Figura 11, panel b) y 0.94 para ABTS^{·+} (Figura 12, panel b), así mismo, esta correlación se evidencia en el análisis de componentes principales (Figura 25).

La mayoría de los estudios acerca de la capacidad antioxidante de frijol y su efecto protector en algunas enfermedades han sido basados en estudios *in vitro* y son pocos los estudios de actividad antioxidante *in vivo*, los cuales dan una idea de la interacción de diversos procesos de digestión, metabolismo y degradación de compuestos antioxidantes en un organismo completo. Por esta razón para ver la actividad antioxidante *in vivo* se desarrolló una metodología con un modelo biológico sencillo y fácilmente manejable en el laboratorio, *C. elegans*.

El estrés oxidativo al que se sometió *C. elegans* fue a través de dos moléculas muy diferentes para observar los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos en beneficio a la salud. En el ser humano, el estrés oxidativo con las especies reactivas del oxígeno como el H_2O_2 participan en enfermedades de gran importancia clínica como la aterosclerosis, Parkinson, encefalopatías, Alzheimer y es parte del proceso de envejecimiento (Meyers y col, 1996). Por el otro lado una alta concentración de glucosa en el organismo causa enfermedades como la diabetes, la cual reduce la esperanza de vida y trae complicaciones renales en etapa avanzada (Huo y col., 2016).

En el caso de estrés ocasionado con H_2O_2 el frijol Escumite obtuvo los mejores resultados en su estado crudo con las dos concentraciones de compuestos fenólicos evaluadas y conservó su actividad después de la cocción solo por el método moderno (Tabla 12). El extracto de frijol crudo aumentó un 32% la CL_{50} e inclusive cuando se encontraba cocido en olla express y después de frito, aumentó un 6.5% el valor CL_{50} , respecto al control (Figura 21), lo que significa que se necesita una mayor concentración de esta ERO para causar la muerte de la mitad de la población.

Ese fenómeno solo se vio en esta semilla, las demás semillas de frijol analizadas al someterse a una cocción pierden parcialmente su actividad antioxidante, esto reflejado en una CL_{50} más baja respecto al control. La actividad antioxidante *in vitro* del frijol Rojo no se observó de igual manera en los ensayos *in vivo* donde esta semilla inclusive cruda no aumentó la CL_{50} con respecto al control (Figura 20). Esto demuestra que los compuestos del cultivar Rojo son buenos para neutralizar radicales libres a nivel laboratorio, esto demostrado por los resultados obtenidos en el ensayo DPPH \cdot . Sin embargo, este radical no se encuentra de manera natural en un sistema vivo donde ya se involucran procesos metabólicos.

Caso contrario a este ejemplo, es el frijol Escumite, cuyos compuestos además de neutralizar radicales libres tienen buena actividad en ensayos *in vivo* evaluado en *C. elegans*, sometido a estrés oxidativo. Este resultado comprueba lo observado *in vitro*, donde el extracto de frijol Escumite tuvo la mejor actividad en el ensayo FRAP, que es un método considerado adecuado para evaluar la capacidad de algún compuesto para modular el tono REDOX de células y tejidos (García, 2005). Se sabe que el hierro forma parte esencial de la respiración celular como transportador de electrones en los citocromos y que está presente en enzimas involucradas en el sistema antioxidante enzimático como las catalasas y peroxidasas (Forrellat y col., 2000).

Se podría correlacionar los resultados obtenidos con este método a una posible actividad *in vivo*, ya que los seres vivos naturalmente mantienen un entorno reductor dentro de sus células a través de un aporte de energía metabólica y un desbalance en

ese estado REDOX ocasiona un estrés oxidativo por la excesiva producción de radicales libres (Schafer y Buettner, 2001). Por lo que, si se quiere evaluar la actividad antioxidante de algún compuesto o extracto, la técnica FRAP sería una buena opción de ensayo *in vitro* para después ser complementada con ensayos *in vivo*.

Enfermedades como la diabetes y sus complicaciones, como la disminución en la esperanza de vida están estrechamente relacionadas con un incremento en el estrés oxidativo al tratar de metabolizar la glucosa que entra a la célula, esta glucosa pasa por los procesos de glucólisis y ciclo de Krebs hasta llegar a la cadena respiratoria en la mitocondria, donde se genera la mayor cantidad de radicales libres generando un desorden metabólico y estrés oxidativo (Huo y col., 2016).

Por lo anterior, resultó interesante evaluar el tiempo de vida del nemátodo *C. elegans* en presencia de extracto de frijol y sometido a un estrés oxidativo causado por alta concentración de glucosa como una medida de la actividad antioxidante. En este ensayo con la concentración reportada por Schlotterer y col. (2009), no se observó un cambio significativo en la reducción del tiempo de vida de *C. elegans*, por lo que se utilizó el doble de esa concentración en el medio de cultivo para poder observar diferencias significativas. En condiciones normales el tiempo de vida fue de 25 días y muere el 50% de la población el día 20 y el resto hasta el día 25. Cuando *C. elegans* fue sometido a estrés oxidativo la supervivencia se redujo un 30% con respecto al control en el día 20 (Figura 24, líneas azules).

El extracto de frijol Escumite crudo logró aumentar un 10% la supervivencia de *C. elegans* a partir del día 20 en medio de cultivo sin glucosa (Figura 24, líneas continuas), lo cual indica un efecto positivo en el tiempo de vida de este nemátodo en condiciones normales de crecimiento. En condiciones de estrés oxidativo se observó una supervivencia del 40% en presencia del extracto de frijol Escumite a una concentración de 50 µg/mL en comparación con los nemátodos que se encontraban en medio de cultivo control, el cual contenía solamente glucosa a los 20 días del ensayo.

Como el frijol se somete a una cocción antes de ingerirlo y la menor actividad antioxidante en el ensayo con H₂O₂ fue con el extracto de semilla frita procedente del método tradicional de cocción se decidió evaluar el extracto de la semilla sometida a ese tratamiento, el cual incrementó un 10% la supervivencia de *C. elegans* con respecto al control sometido a estrés oxidativo. Estos resultados indican que el extracto de frijol Escumite provee una protección a *C. elegans* sometido a estrés oxidativo y que al parecer los compuestos responsables de ese efecto son estables después de la cocción lo que hace a este frijol recomendable para combatir el estrés oxidativo ocasionado por formación de radicales libres provocados por una alta concentración de glucosa.

El efecto hipoglucemiante del frijol se ha demostrado en estudios *in vivo*, con animales diabéticos a los cuales se le adicionó harina de frijol a su dieta diaria y se observó una disminución en los niveles de glucosa, además atribuido a un incremento en los niveles de expresión de enzimas antioxidantes (Roman y col., 1995; Lomas, 2008; Huo y col., 2016).

10. Addendum

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada que constituye un factor de riesgo para la salud pública, además de la resistencia de algunos microorganismos a antibióticos comerciales, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano. Entre esas fuentes naturales los extractos vegetales han sido ampliamente estudiados y la actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es atribuida entre otros compuestos a los fenólicos presentes en sus extractos, por lo que fue de interés realizar una prueba antimicrobiana con extractos de frijol ya que es una fuente natural y rica en este tipo de compuestos (Domingo y López, 2003).

Los lugares y el número de grupos hidroxilo (-OH) en el anillo fenólico parece estar relacionado directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación de la molécula está ligado a una mayor toxicidad (Lara y col., 2008) y el principal mecanismo de acción parece ser la inhibición enzimática (Domingo y López, 2003).

Las leguminosas han sido objeto de reciente investigación acerca de metabolitos relacionados con prevención de enfermedades causadas por bacterias. En el 2010, investigadores de India estudiaron la actividad antimicrobiana de *Cajanus cajan* L. (Pigeon Pea) un guisante de la región perteneciente a la familia de las leguminosas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumonia*. Ellos encontraron que los compuestos responsables de dicha actividad se encuentran en la testa del guisante y que el efecto es mayor contra bacterias Gram negativas (Chikane y col., 2010).

10.1 Actividad antimicrobiana de frijol

Se han hecho estudios sobre la actividad antimicrobiana del frijol y se ha atribuido dicha actividad a los compuestos fenólicos presentes en la semilla. Lara y col. (2008), probaron extractos metanólicos y acuosos de frijol Perla (color negro) obtenido en el estado de Guanajuato y encontraron actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas de humanos de las especies *Escherichia*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* con el extracto metanólico a una concentración de 5 mg/mL de compuestos fenólicos. El efecto observado es atribuido, según los autores, a flavonoides y taninos presentes en la testa de la semilla.

Ariza (2013) determinó la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de semilla cruda de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) negro, pinto y amarillo, y observó que la cantidad y el perfil de compuestos flavonoides están correlacionados con el color de la

testa. Realizó además un ensayo de actividad antimicrobiana contra bacterias de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* y los resultados se expresaron como concentración mínima inhibitoria (CMI). En todos los géneros de bacterias hubo inhibición del crecimiento y se obtuvo la mayor actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, atribuido a los metabolitos secundarios de naturaleza flavonoide extraídos. Las CMI variaron de 0.5 mg/ mL de compuestos fenólicos para el frijol pinto hasta 12.5 mg/mL para el frijol negro en esta bacteria.

Estos estudios demuestran que el frijol no solo es un alimento nutritivo, también es un alimento que contiene compuestos con un beneficio a la salud, sin embargo, solo se han reportado investigaciones acerca de la actividad antimicrobiana de extractos de frijol común (*P. vulgaris*) crudo, por este motivo se planteó analizar la actividad antimicrobiana que tienen distintas especies de frijol así como estudiar semillas de frijol criollas que podrían tener esta actividad y saber cómo afectan los distintos métodos de cocción los compuestos responsables de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas de humano.

10.2 Metodología

Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de semilla de frijol crudo y sometido a una cocción por diferentes métodos con la técnica de antibiogramas (Cavaliere y col., 2005) contra las bacterias Gram negativas *Serratia* sp y *Escherichia coli* clínica y contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* clínica; como un control se utilizó la cepa no patógena *Escherichia coli* OP50.

Brevemente, en cajas de Petri se esparcieron 100 µL de cada bacteria en forma de tapete, posteriormente se agregaron 10 µL del extracto metanólico crudo (por triplicado) en círculos de papel absorbente de 7 mm de diámetro. Se usaron como controles negativos metanol al 50% que es el solvente utilizado para la extracción, aceite comestible, con el cual se realizó el freído de la semilla y como control positivo se utilizó Amikacina, un antibiótico de amplio espectro, a una concentración de 125 µg/mL.

Las cajas de Petri se dejaron incubar por 24 horas. Las bacterias *E. coli* OP50 y *Serratia* sp se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y las bacterias *E. coli* clínica y *S. aureus* clínica a una temperatura de 37°C. Después de ese tiempo se midió el halo de inhibición al cual se le restó el diámetro del papel filtro. Los resultados se expresan en milímetros (mm) de inhibición.

10.3 Resultados y discusión

Frijol crudo

La mejor inhibición se obtuvo contra la bacteria control *E. coli* OP50 y contrastantemente la actividad más baja fue contra la bacteria *E. coli* de origen clínico, con lo cual se

puede ver el efecto diferencial de los extractos de frijol ante las diferentes cepas de la misma bacteria.

Las bacterias patógenas poseen mecanismos bien desarrollados para infectar a un huésped de una manera agresiva y a lo largo del tiempo han adquirido resistencia a algunos antibióticos comerciales a través de modificaciones de sus características a fin de sobrevivir, por lo cual hubo una menor inhibición en las cepas clínicas.

Las semillas comerciales analizadas tuvieron una mejor inhibición contra las cuatro bacterias utilizadas en este estudio en comparación con las semillas criollas, esto es quizá debido a la modificación genética de este tipo de semillas que les confiere una mayor resistencia a patógenos presentes en la rizósfera.

En cuanto al color de la semilla aquellas pintas (Pinto y Escumite) tuvieron la mayor inhibición contra *E. coli* OP50, *Serratia* sp y *E. coli* clínica y las semillas de color rojo (Rojo y Rojo sangre de toro), fueron las de mejor actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, estos resultados resaltan la importancia de estudiar el perfil de compuestos fenólicos de cada semilla y su acción contra bacterias. Se sabe que los frijoles rojos son ricos en taninos y antocianinas mientras que en los frijoles de coloraciones claras se identifican flavonoles como Kaempferol y Quercetina (Luthia y Pastor, 2006).

En el análisis de las semillas crudas se observó que el extracto de frijol Pinto fue el que tuvo la mayor inhibición contra la bacteria no patógena *E. coli* OP50 (7.3 mm) y el frijol Rojo tuvo el mejor efecto antimicrobiano contra *E. coli* (2.0 mm), por otro lado, el extracto de frijol Peruano fue el de mayor diámetro de inhibición contra *S. aureus* (2.1 mm) y *Serratia* sp (3.4 mm). El extracto que tuvo la menor actividad antimicrobiana fue el del frijol Negro de vara con una inhibición de 1.4 mm para *E. coli* OP50, 0.4 mm para *S. aureus*, 1.3 mm contra *Serratia* sp y 0.3 mm contra *E. coli* clínica (Tabla 9). El antibiótico comercial Amikacina a una concentración de 125 µg/mL tuvo halos de inhibición de 20.6 hasta 25.0 mm (Tabla 16), por lo que el extracto de semilla cruda de frijol tiene poca actividad antimicrobiana comparada con aquella observada con un antibiótico comercial y se necesitaría una concentración grande de compuestos fenólicos para ver una inhibición similar además de realizar un ensayo para ver si se trata de un efecto bactericida o solo bacteriostático.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de frijol crudo.

SEMILLA CRUDA				
FRIJOL	mm de inhibición			
	<i>E. coli</i> OP50	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia</i> sp	<i>E. coli</i> clínica
metanol 50%	0.0	0.0	0.0	0.0
Escumite	4.3 ± 0.1 cd	1.0 ± 0.1 bc	3.0 ± 0.1 a	0.8 ± 0.0 c
Pinto	7.3 ± 0.1 a	1.5 ± 0.0 abc	2.3 ± 0.1 ab	1.8 ± 0.1 ab
Negro de vara	1.4 ± 0.0 e	0.4 ± 0.0 c	1.3 ± 0.01 b	0.3 ± 0.0 c
Negro Jamapa	1.6 ± 0.1 e	0.7 ± 0.0 bc	1.6 ± 0.1 b	0.6 ± 0.0 c
Alubia blanca	5.4 ± 0.1 bc	1.3 ± 0.1 abc	2.5 ± 0.1 ab	0.7 ± 0.0 c
Peruano	4.3 ± 0.1 cd	2.1 ± 0.1 a	3.4 ± 0.0 a	0.9 ± 0.1 bc
Rojo sangre de toro	2.9 ± 0.1 de	1.4 ± 0.1 abc	1.5 ± 0.1 b	0.6 ± 0.0 c

Rojo	6.3 ± 0.1 ab	1.7 ± 0.0 ab	2.1 ± 0.1 ab	2.0 ± 0.0 a
Amikacina 125 µg/mL	25.0 ± 0.1	23.4 ± 0.0	20.7 ± 0.0	20.6 ± 0.0

MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, n=9, \pm SD, letra diferente por columna denota diferencia significativa.

Frijol cocido y frito

La actividad antimicrobiana de las semillas sometidas a cocción disminuyó de diferente manera según el método utilizado, por lo que algunas semillas fueron efectivas cuando el frijol se coció de la manera tradicional y en otros casos se tuvo resultados después de la cocción en olla express.

En la cocción con el método moderno los cultivares con mejor resultado fueron las semillas comerciales, el frijol Peruano contra *E. coli* OP50, *S. aureus* y *Serratia* sp y el frijol Pinto contra *E. coli* clínica (Tabla 17). En cambio, en la cocción tradicional se observaron los mejores resultados con las semillas de frijol Pinto contra *E. coli* OP50 y *Serratia* sp, Peruano contra *S. aureus* y Rojo contra *E. coli* clínica (Tabla 18).

Los cultivares de testa clara (Alubia blanca y Peruano) tuvieron mejor actividad antimicrobiana después de ser cocidos en olla express contra la bacteria control *E. coli* OP50, en cambio los cultivares de testa negra (Negro de vara y Negro Jamapa) resultaron tener un mayor halo de inhibición cuando se cocieron en olla de barro.

En el caso de *E. coli* clínica los cultivares pintos (Pinto y Escumite) tuvieron mayor halo de inhibición cuando se cocieron en olla express (Tabla 17) en comparación con el método tradicional, en donde el cultivar Escumite perdió totalmente la actividad antimicrobiana, lo que sugiere que los compuestos responsables de la actividad microbiana presentes en el extracto de esta semilla son severamente afectados por el largo tiempo de exposición al calor del método tradicional. Con los frijoles de coloración negra ocurrió lo contrario, hubo un mejor resultado cocidos en olla de barro, lo cual indica que los compuestos fenólicos de las semillas negras son muy susceptibles a una alta temperatura, sin embargo, no se pierden totalmente ya que si hubo una inhibición del crecimiento bacteriano y en el caso de la Alubia blanca no hubo ninguna diferencia entre métodos de cocción.

La inhibición contra *S. aureus* clínica se vio con las semillas de frijol Escumite y Negro de vara cocidos en olla express, los demás cultivares tuvieron un mejor resultado cocidos en olla de barro (Tabla 18). Con el método moderno de cocción se tuvo un porcentaje de pérdida del 47% y solo un 27% con el método tradicional, lo cual indica que para la inhibición de esta bacteria patógena en particular se requieren compuestos termoestables a temperaturas elevadas por lo que la cocción no es una buena opción si se quieren extraer dichos compuestos.

Para la bacteria patógena oportunista *Serratia* sp resultaron ser efectivos los extractos de frijol cocidos por el método moderno en todas las semillas de frijol analizadas en comparación con aquellas sometidas al método tradicional (Tablas 17 y 18), esto puede ser debido a que se tenga una mayor cantidad de los compuestos fenólicos responsables de la actividad antimicrobiana por el método moderno de cocción. En el

caso de las semillas cocidas en olla express la mayor inhibición se observó con el frijol Peruano (2.6 mm) y dentro de las semillas cocidas en olla de barro el mejor resultado se obtuvo con el frijol Pinto (2.0 mm).

Tabla 16. Actividad antimicrobiana de frijol cocido en olla express.

SEMILLA COCIDA (OLLA EXPRES)				
	mm de inhibición			
FRIJOL	<i>E. coli</i> OP50	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia</i> sp	<i>E. coli</i> clínica
metanol 50%	0.0	0.0	0.0	0.0
Escumite	3.1 ± 0.1 ab	1.0 ± 0.1 ab	2.0 ± 0.0 ab	0.4 ± 0.0 bc
Pinto	3.5 ± 0.2 ab	1.2 ± 0.0 ab	2.3 ± 0.0 ab	1.5 ± 0.1 a
Negro de vara	1.2 ± 0.1 c	0.4 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 c
Negro Jamapa	1.2 ± 0.1 c	0.2 ± 0.0 b	1.3 ± 0.1 b	0 c
Alubia blanca	2.2 ± 0.1 bc	0.2 ± 0.0 b	2.0 ± 0.1 ab	0.7 ± 0.1 abc
Peruano	4.1 ± 0.2 a	1.3 ± 0.1 a	2.6 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 abc
Rojo sangre de toro	2.1 ± 0.1 bc	0.3 ± 0.0 ab	1.9 ± 0.1 ab	0.3 ± 0.0 c
Rojo	3.9 ± 0.1 ab	0.2 ± 0.0 b	1.8 ± 0.0 ab	1.3 ± 0.0 ab
Amikacina	25.0 ± 0.1	23.4 ± 0.0	20.7 ± 0.1	20.6 ± 0.1

MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, n=9, \pm SD, letra diferente por columna denota diferencia significativa.

Tabla 17. Actividad antimicrobiana de frijol cocido en olla de barro.

SEMILLA COCIDA (OLLA DE BARRO)				
	mm de inhibición			
FRIJOL	<i>E. coli</i> OP50	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia</i> sp	<i>E. coli</i> clínica
metanol 50%	0.0	0.0	0.0	0.0
Escumite	1.0 ± 0.1 b	0.8 ± 0.1 ab	1.0 ± 0.1 ab	0 c
Pinto	5.0 ± 0.1 a	1.3 ± 0.1 a	2.0 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.1 ab
Negro de vara	1.3 ± 0.0 b	0.2 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 c
Negro Jamapa	1.5 ± 0.0 b	0.5 ± 0.0 ab	0.8 ± 0.1 ab	0.4 ± 0.0 bc
Alubia blanca	2.0 ± 0.1 b	1.3 ± 0.0 a	1.4 ± 0.1 ab	0.8 ± 0.0 abc
Peruano	1.3 ± 0.0 b	1.4 ± 0.0 a	1.1 ± 0.0 ab	0.6 ± 0.0 bc
Rojo sangre de toro	1.8 ± 0.1 b	0.9 ± 0.1 ab	1.0 ± 0.1 ab	0.4 ± 0.0 bc
Rojo	4.0 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 ab	0.8 ± 0.0 ab	1.7 ± 0.0 a
Amikacina	25.0 ± 0.1	23.4 ± 0.1	20.7 ± 0.1	20.6 ± 0.1

MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, n=9, \pm SD, letra diferente por columna denota diferencia significativa.

Los resultados fueron más variables con los extractos de frijol frito, para *E. coli* OP50 las semillas criollas de frijol Escumite, Negro de vara y la Alubia blanca que estaban cocidas en olla express tuvieron una mejor inhibición que las semillas comerciales de los mismos colores (Pinto, Negro Jamapa y Peruano). Las semillas de testa roja

mostraron mejor inhibición cuando estaban previamente cocidas en olla de barro sin mostrar diferencia significativa entre tipo criolla o comercial de semilla. Los cultivares que se habían cocido previamente en olla express y que tuvieron mayor inhibición fueron la Alubia blanca contra *E. coli* OP50, Escumite y Rojo contra *S. aureus*, Escumite contra *Serratia* sp y Pinto contra *E. coli* clínica (Tabla 19).

En cuanto a los frijoles que se habían cocido en olla de barro, destacan el cultivar Rojo contra *E coli* OP50 y el Pinto contra *S. aureus*, *Serratia* sp y *E. coli* clínica (Tabla 20).

Serratia sp se comporta de manera similar ante los extractos de frijoles criollos y comerciales, el frijol Escumite tuvo el mejor resultado cuando estaba cocido en olla express mientras que su contraparte comercial, el frijol Pinto perdió totalmente su actividad antimicrobiana marcando la diferencia entre un cultivo que es para la comercialización y ha sido modificado genéticamente y aquel que solo ha tenido una selección natural de la semilla para su cultivo (Tabla 19).

La mayoría de los extractos de frijol previamente cocido por el método moderno mostraron inhibición contra *S. aureus* excepto los frijoles Pinto y Peruano que mostraron mejor actividad cuando provenían de la cocción en olla de barro (Tabla 20).

El aceite comestible con que se llevó a cabo el freído de la semilla y el metanol al 50% no mostraron halo de inhibición en ningún caso.

Tabla 18. Actividad antimicrobiana de frijol frito previamente cocido en olla express.

SEMILLA FRITA (OLLA EXPRESS)				
FRIJOL	mm de inhibición			
	<i>E. coli</i> OP50	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia</i> sp	<i>E. coli</i> clínica
metanol 50%	0.0	0.0	0.0	0.0
Escumite	2.0 ± 0.1 ab	1.0 ± 0.0 n.s.	1.9 ± 0.1 a	0.3 ± 0.0 b
Pinto	1.9 ± 0.1 ab	0.0 n.s.	0.7 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.0 a
Negro de vara	1.2 ± 0.0 b	0.4 ± 0.0 n.s.	1.2 ± 0.1 ab	0.1 ± 0.0 b
Negro Jamapa	0.8 ± 0.1 b	0.1 ± 0.0 n.s.	0.9 ± 0.1 ab	0.0 b
Alubia blanca	3.1 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 n.s.	1.8 ± 0.1 ab	0.9 ± 0.1 ab
Peruano	0.2 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 n.s.	0.5 ± 0.1 b	0.5 ± 0.0 ab
Rojo sangre de toro	1.3 ± 0.1 ab	0.3 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.1 ab	0.3 ± 0.0 b
Rojo	0.9 ± 0.0 b	1.0 ± 0.0 n.s.	1.3 ± 0.0 ab	0.6 ± 0.0 ab
Amikacina	25.0 ± 0.1	23.4 ± 0.0	20.7 ± 0.1	20.6 ± 0.1
Aceite comestible	0.00	0.00	0.00	0.00

MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, n=9 n.s.=Diferencia no significativa letra diferente por columna denota diferencia significativa

Según el tipo de semilla, se tuvo una mayor actividad antimicrobiana con semillas de frijol comerciales que con semillas criollas, esta diferencia fue clara en el caso de la bacteria *E. coli* OP50 y *E. coli* clínica (Figura 28). En lo referente al color de la semilla para *E. coli* OP50 la mejor inhibición fue obtenida con los extractos de frijoles pintos, para *S. aureus* con los de frijol de color claro; para *Serratia* sp con los extractos de frijol pinto y claro y para *E. coli* clínica con los extractos de frijol negro (Figura 29). Lo

anterior sugiere que en la actividad antimicrobiana podría ser de relevancia el perfil de compuestos fenólicos presente en la semilla de frijol, ya que este perfil cambia de distinta forma según la temperatura o el tiempo de cocción. En este sentido, la cocción en olla express conserva compuestos que inhiben a *E. coli* OP50 y *Serratia* sp, mientras que en la cocción en olla de barro se conservan aquellos que inhiben a *S. aureus* y *E. coli* clínica (Figura 29).

Tabla 19. Actividad antimicrobiana de frijol frito previamente cocido en olla de barro.

SEMILLA FRITA (OLLA DE BARRO)				
	mm de inhibición			
FRIJOL	<i>E. coli</i> OP50	<i>S. aureus</i>	<i>Serratia</i> sp	<i>E. coli</i> clínica
metanol 50%	0.0	0.0	0.0	0.0
Escumite	0.9 ± 0.1 c	0.8 ± 0.0 ab	0.9 ± 0.0 ab	0.0 b
Pinto	2.9 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.0 a	1.7 ± 0.1 a	1.3 ± 0.0 a
Negro de vara	1.1 ± 0.1 bc	0.1 ± 0.0 b	0.2 ± 0.1 b	0.3 ± 0.0 b
Negro Jamapa	1.4 ± 0.1 bc	0.4 ± 0.0 ab	0.8 ± 0.1 ab	0.3 ± 0.0 b
Alubia blanca	2.2 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.0 a	1.5 ± 0.0 ab	0.8 ± 0.0 ab
Peruano	1.3 ± 0.1 bc	1.3 ± 0.0 a	1.0 ± 0.0 ab	0.6 ± 0.0 ab
Rojo sangre de toro	1.7 ± 0.0 bc	0.8 ± 0.1 ab	0.9 ± 0.0 ab	0.3 ± 0.0 b
Rojo	4.1 ± 0.1 a	0.7 ± 0.0 ab	1.6 ± 0.1 ab	0.1 ± 0.0 b
Amikacina	25.0 ± 0.1	23.4 ± 0.1	20.7 ± 0.1	20.6 ± 0.1
Aceite comestible	0.00	0.00	0.00	0.00

MF ANOVA, Tukey $\alpha = 0.05$, $n=9$, letra diferente por columna denota diferencia significativa

Adicionalmente, la pérdida de la actividad antimicrobiana fue mayor en semilla frita procedente del método moderno de cocción, mientras que no hubo diferencia estadística entre semilla cocida y frita con el método de cocción tradicional (Figura 30). Para observar el comportamiento de las variables de método de cocción, tipo y color de la semilla que se muestran en las figuras 29, 30 y 31 no se muestra el análisis estadístico ya fueron obtenidas mediante un modelo multivariado. En este análisis se agrupan las diversas variables relacionadas con la de interés por lo cual se acumula la varianza de cada una de ellas, de tal manera que no se obtienen diferencias significativas al analizar los datos por los métodos estadísticos convencionales.

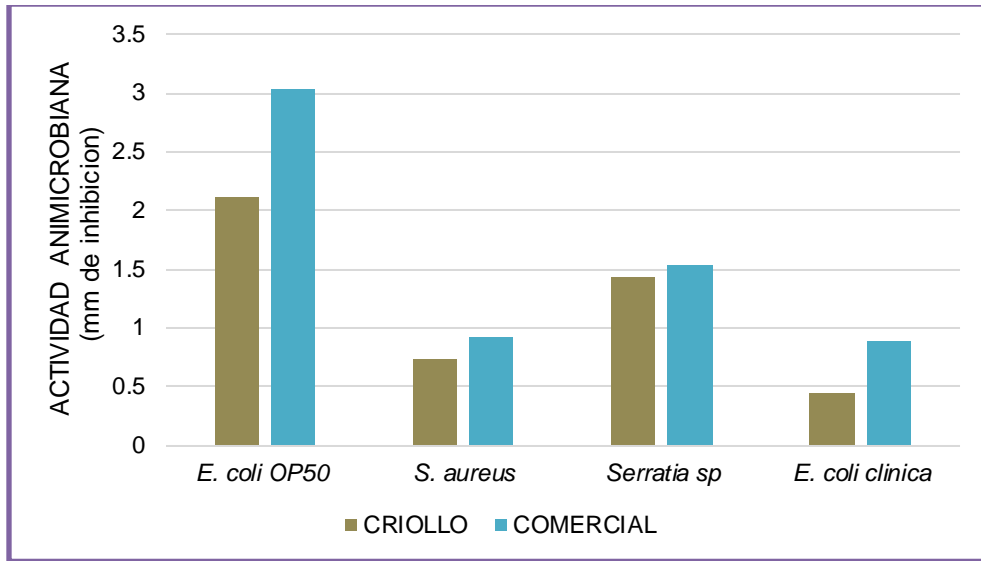


Figura 29. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol criollas y comerciales.

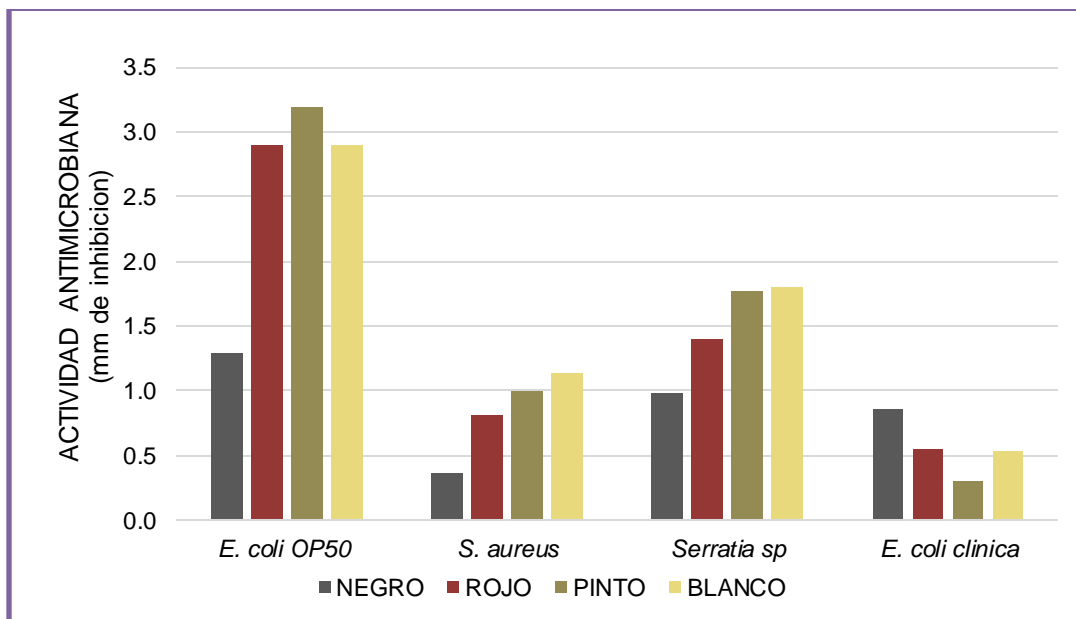


Figura 30. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol según su color.

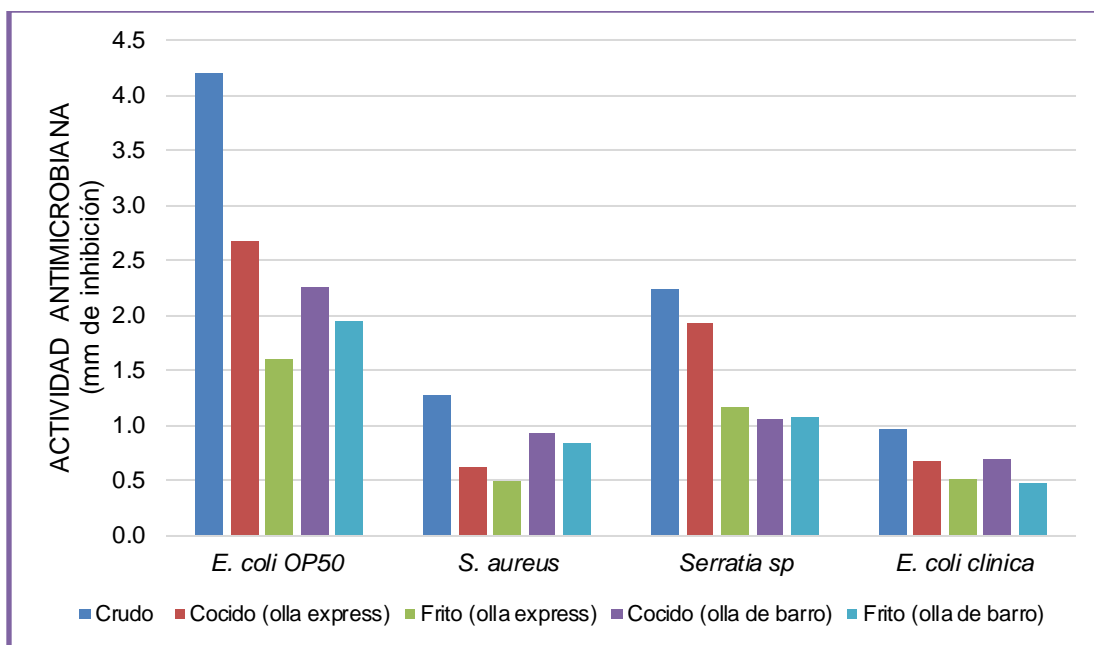


Figura 31. Actividad antimicrobiana de semillas de frijol según el método de cocción.

10.4 Conclusión de Addendum

Los extractos metanólicos de frijol tienen actividad antimicrobiana, sin embargo, en términos generales su actividad es moderada contra las bacterias patógenas *E. coli*, *S. aureus* y *Serratia sp*.

11. CONCLUSIÓN

El frijol comercial tuvo un mayor contenido de compuestos fenólicos con respecto al frijol criollo, sin embargo, la variedad criolla Escumite (*P. acutifolius*) presentó la mejor actividad antioxidante *in vivo* con respecto al resto de las semillas, y se observó una menor pérdida de esta actividad con el método moderno de cocción en comparación al tradicional.

12. PERSPECTIVAS

Por el gran consumo de frijol en nuestro país y ya que es fuente de metabolitos que muestran propiedades antioxidantes *in vivo*, es importante seguir investigando acerca del potencial nutracéutico de esta leguminosa abordando los siguientes aspectos:

- Continuar la exploración del germoplasma de frijol en México.

- Evaluar la actividad antioxidante *in vivo* de las fracciones de los extractos metanólicos de frijol.
- Identificar los compuestos presentes en los extractos metanólicos por medio de HPLC-MS

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abd E. I., Habiba R. A. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *Food Sci. Technol.*, 36: 286-290.
- Acosta J. A, Rosales R., Navarrete R. y López E. (2000). Desarrollo de variedades mejoradas de frijol para condiciones de riego y temporal en México. *Agric. Tec. Méx.* 26: 79-98.
- Acosta J.A., Kelly J.D., Gepts P. (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Sci.* 47: S44-S59.
- Almanza E., Guzmán I., Acosta J.A., Mora A., Acosta J., Guzmán S.H. (2008). Phytochemical content of black seeded bean cultivars after cooking and frying. *Annual Report Bean Cooperative.* 51:104

- Angel G. del C. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) contra la oxidación *in vitro* de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tesis de maestría en ciencias en Biotecnología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Pp.76
- Aparicio X., Reynoso R., Castaño E., García T., Gonzáles E., Guzmán S.H., Elizondo G., Gabra G., Lila M.A. y Loarca G. (2008). Antiradical Capacity and Induction of apoptosis on Hela cell by a *Phaseolus vulgaris* extract. Plant Foods Hum. Nutr. 63:35-40
- Ariza T. de J., Berber G. E., Ramírez M.G., Yáñez J. (2013). Methanolic Extracts Antioxidant and Antimicrobial Activities from Five Varieties of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). IJERT. 2: 3196-3201.
- Ayala A. (2014). Determinación del potencial antioxidante de la planta *Acmella radicans* (Jacquin) R.K. Jansen. Tesis de licenciatura de la facultad de biología de la UMSNH. Pp.39.
- Badui S. Química de alimentos. Cuarta edición editorial PEARSON. México 2006. Pp. 736.
- Brand W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm -Wiss U. Technol. 28:25-30.
- Benzie I.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239:70-76
- Bressani R., de Mora D., Flores R., Gómez R. (1990). Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en el frijol crudo y cocido y el efecto que estos provocan en la digestibilidad de la proteína. Arch. Latinoam. Nutr. 41:570-583.
- Campos R., Reynoso R., Pedraza G., Acosta J.A., Guzmán S.H., Paredes O., Ooman B.D., Loarca G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Food Sci. 74: 59-65.
- Cavalieri S.J., Rankin I.D., Harbeck R.J., Sautter R.L., McCarter Y.S. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Primera edición. Americ. Soci. Microb. Pp. 40-48.
- Chikane M.R., Parwate D.V., Ingle V.N. (2010). *In vitro* study of antibacterial activity γ -irradiated and unirradiated leguminous seed coats. IJPBA 1: 335-337.
- Clemente A., Domoney C. (2001). Anticarcinogenic activity of protease inhibitors in legumes. Memorias de la 4^{ta} Conferencia Europea de Granos y Leguminosas a través de una Producción Sustentable, Paris, Francia Pp.114-115.

- Delgado A., Turley A.T., Richman A., Lavin M. (1991). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). Syst. Bot. 24:438-460.
- Díaz L., Widholm J., Fahey G. C., Castaño E., Paredes O. (2006). Chemical components whit Health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.), J. Agric. Food Chem. 54: 2045-2052.
- Domingo D., López M. (2003). Plantas con acción microbiana. Rev. Esp. Quimioterap. 16: 385-393.
- Erkoç S., Erkoç F. y Keskin N. (2003). Theoretical investigation of quercetin and its radicals isomers. J. Mol. Struct. 631:141- 146.
- Espinosa L. (2004). Cambios del modo y estilo de vida; su influencia en el proceso salud-enfermedad. Rev Cubana Estomatol. 41: 3-5.
- Espinosa L.G. (2006). Diversidad Genética y Caracterización Nutricional y Nutracéutica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado en Ciencias del Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados del IPN. Pp. 195
- Forrellat M., Gautier H. y Fernandez N. (2000). Metabolismo del Hierro. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. 3: 149-160.
- Gálvez L., Genovese M. I., Lajolo F.M. (2009). Effect of different cooking conditions of phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. J. Agric. Food Chem. 57: 5734-5742.
- García F.J. (2005). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidants. Tesis doctoral de la Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, España. Pp. 188
- Goldberg I. (1994). Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Editorial Chapman and Hall. Pp. 3-1
- Gutteridge J.M., Halliwell B. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys 280: 1-8.
- Guzmán I., Almanza E., Acosta J. A., Guzmán S.H. (2009). Estudio comparativo de características de calidad entre genotipos de frijol de grano negro. Agric. Tec. Méx. 35: 446-454.
- Guzmán S.H., Paredes O. (1999). Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop plants. In Molecular Biotechnology for Plant Food Production. Technomic Publishing Co. Pp. 553-620.

- Guzmán S. H., Acosta J. A., Álvarez M., García S., Loarca G. (2002). Calidad Alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Agric. Tec. Méx. 28: 159-173.
- Granito M., Brito Y., Torres A. (2007). Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. J. Sci. Food Agric. 87: 2801-2809.
- Hangen L., Bennink M. (2002). Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. Nutr. Cancer. 44: 60-65
- Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Romani A. (2005). Rapid test to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry bean. J. Agric. Food Chem. 53: 3053-3056.
- Helbig E., Costa de Oliveira A., da Silva K. (2003). Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the protein value. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 49: 81-86.
- Hernández V. M., Vargas M. L., Muruaga J. S., Hernández S., Mayek N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. Rev. Fitotec. Méx 36: 95-104
- Hernández C., Campos A. (1993). Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. Agron. Mesoam. 4: 42-47
- Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B. y Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet. 342: 1007-1011
- Huo L., Shaw J. E., Wong E., Harding J.L., Peeters A., Magliano D. (2016). Burden of diabetes in Australia: life expectancy and disability-free life expectancy in adults with diabetes. Diabetología. 59: 1437-1445.
- Isely D. (1990). Vascular Flora of the Southeastern United States Part 2: Leguminosae (Fabaceae). The University of North Carolina Press. 1st edition Pp. 277
- Krupa U. (2008). Main nutritional and antinutritional compounds of bean seeds. A review. Pol. J. Food Nutr. Sci. 58:179 -155.
- Lara V.J., Gaytán A., Dávalos A.J., Santos J., Mata B.D., Vargas J., Barbosa A., Sanson M., López A. G., Moreno J.E. (2008). Microbiological and Toxicological Effects of Perla Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 1-6.

- Ladizinsky G. (1998). Plant evolution under domestication. Kluwer Academic Publishers. Pp. 256
- Linnaeus C. (1753). Species Plantarum. 2: 623.
- Lomas M.C. (2008). Efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cocido sobre citosinas proinflamatorias relacionadas con daño renal en ratas diabéticas. Tesis de maestría. Facultad de química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Pp. 90.
- Luthria D., Pastor M.A. (2006). Phenolics acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. J. Food Compos. Anal. 19: 205-211.
- Martínez B., Ibáñez M. V., Rincón F. (2002). Ácido Fítico: Aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Arch. Latinoam. Nutr. 52: 219-231.
- Martínez J. (2013). Efecto del procesamiento en el contenido de compuestos fenólicos y las propiedades antioxidantes de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mexicano. Tesis de licenciatura de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del estado de México. Pp 83.
- Mercado G., De la Rosa L., Wall A., López J.A. y Álvarez E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias consumidas en México. Nutr. Hosp. 28:36-46
- Meyers D., Maloley P., Weeks D. (1996). Safety of antioxidant vitamins. Arch Intern Med. 9: 925-35.
- Moreno E., Cárdenas N., Coballase E., Pedraza J., Carmona L. y Ortega D. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A Useful Model for Studying Metabolic Disorders in Which Oxidative Stress Is a Contributing Factor. Oxid. Med. Cell. Longevity. 2014: 1-9
- Morón M. C., Ávila A. V. y Hernández P. I. (2013). Efecto del consumo de dietas con frijol blanco (*Vigna unguiculata*) con y sin cáscara sobre los lípidos plasmáticos en ratas hipercolesterolemica. Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel". 44: 7-14
- Mújica M. V., Granito M., Soto N. (2012). Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. Bioagro. 24: 163-174.
- Okawa M., Kinjo J., Nohara T., Ono M. (2001). DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Boil Pharm. Bull 24: 1202-1205.

- Panorama agroalimentario Frijol 2015. Boletín informativo publicado por FIRA. Pp.27
- Perea X. P. (2013). Análisis de compuestos fenólicos y valoración de la bioactividad de extractos de testa de *Jatropha curcas* L. no tóxica. Tesis de maestría presentada en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, IPN. Pp.110
- Priess J. R., Hirsh D. I. (1986). *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. Dev. Biol. (1): 156-173
- Porras A., López A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas selectos de Ingeniería de alimentos, Programa de Doctorado en Ciencias de Alimentos Pp. 121-134.
- Ramírez L., Leonel, A., Costa N. (2008). Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. Cienc. Technol. Aliment. 28: 200-213.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26:1231-1237.
- Reyes E., Padilla L. E., Pérez O. y López P. (2008). Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. Invest. Cient. 4: 1-21.
- Reynoso R., Ríos M., Acosta J. A. (2007). El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. Agric. Tec. Méx. 33: 43-52.
- Rodríguez G., García J. A., Rebollar S., Cruz A. C. (2010). Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. Paradig. Económ., 1: 121-145.
- Santiago R., Domínguez M., Barrios E., Andrés A. y Zaragoza F. (2007). Estrés oxidativo en el recién nacido y su influencia en la fisiología vascular pulmonar. Acta Pediatr. Esp. 65:67-71
- Serrano J., Goñi I. (2004). Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. Arch. Latinoam. Nutr. 54: 36–46.
- Solis G.M., Petrascheck M. (2011). Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates. J Vis Exp. 49: 2496.
- Song K., An S., Boo Y. (2011) Comparison of the Antimelanogenic Effects of P-Coumaric Acid and Its Methyl Ester and Their Skin Permeabilities. J. Dermatol. Sci. 63:17-22.

- Schafer F. y Buettner G. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 1191-1212
- Schlotterer A., Kukudov G., Bozorgmehr F., Hutter H., Du X., Oikonomou D., Ibrahim Y., Pfisterer F., Rabbani N., Paul Thornalley P., Sayed A., Fleming T., Per Humpert P., Schwenger V., Zeier M., Hamann A., Stern D., Brownlee M., Bierhaus A., Peter Nawroth P., Morcos M. (2009). *C. elegans* as Model for the Study of High Glucose– Mediated Life Span Reduction. *Diabetes.* 58: 2450-2456.
- Thompson M.D., Mensack M.M., Jiang W., Zhu Z., Lewis M.R. McGinley J.N., Brick M.A., Thompson H.J. (2012) Cell signaling pathways associated with a reduction in mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Carcinogenesis.* 33: 226-232.
- Ulloa J. A., Rosas P., Ramírez J. C., Ulloa B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Fuente.* 8: 5-8.
- Vargas R.D., Torrescano G.R., Mendoza A.M., Vallejo B., Acedo E., Sánchez J.J., Peñalba M.C., Sánchez A. (2013). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana de propóleos. 16: 32-37.
- Wan C., Yu Y., Zhou S., Liu W., Tian S., Cao S. (2011). Antioxidant activity and free radical- scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmac Magazine.* 7: 40-45.
- WormAtlas. <http://www.wormatlas.org>. Accesado 12/jul/2016.

14. ANEXOS

ANEXO A. ESTRUCTURA DE FLAVONOIDES

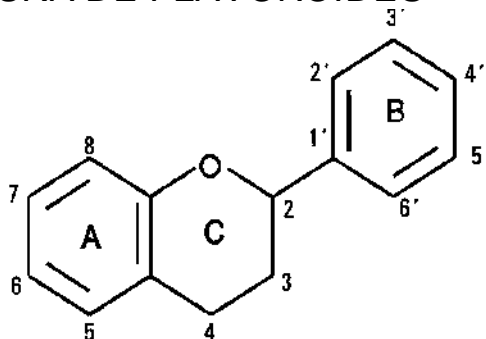


Figura A 1. Estructura general de un flavonoide

ANEXO B. CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

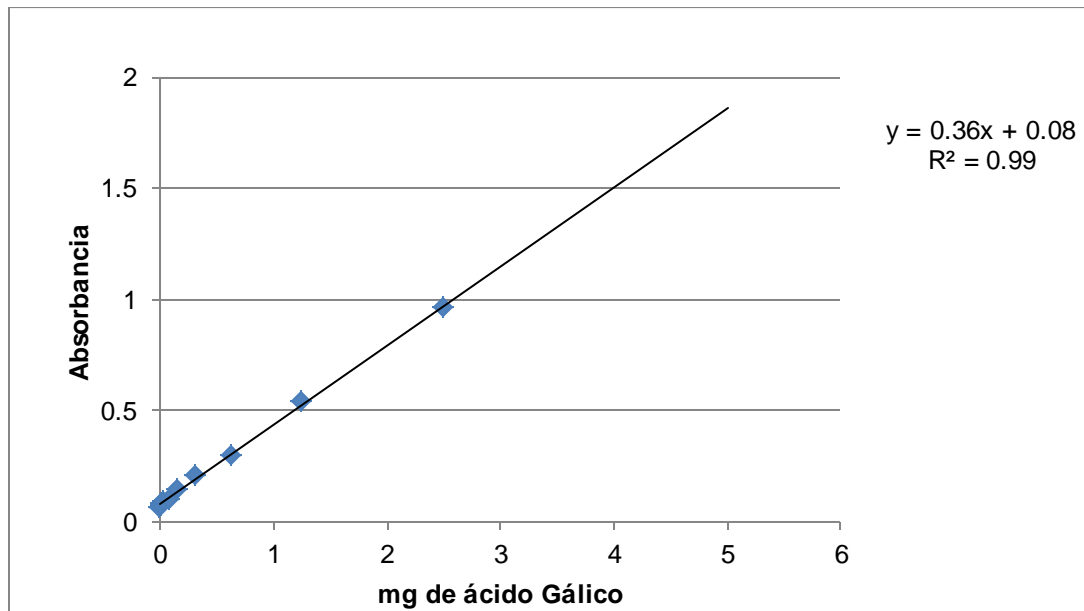


Figura B 2. Curva de calibración para cuantificación del contenido de compuestos fenólicos.

ANEXO C. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

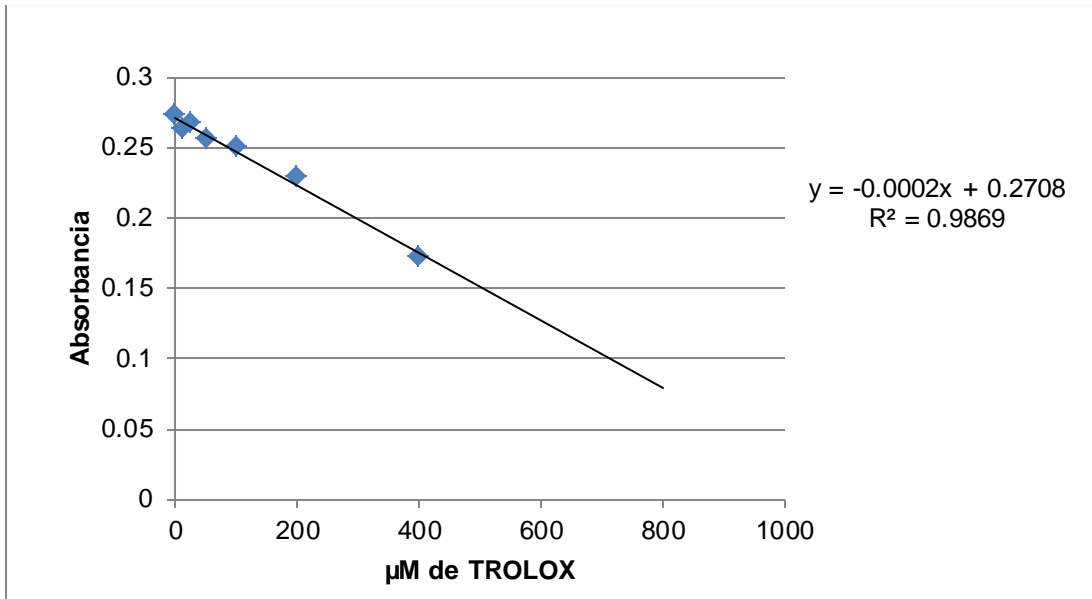


Figura C 1. Curva de calibración de ensayo DPPH.

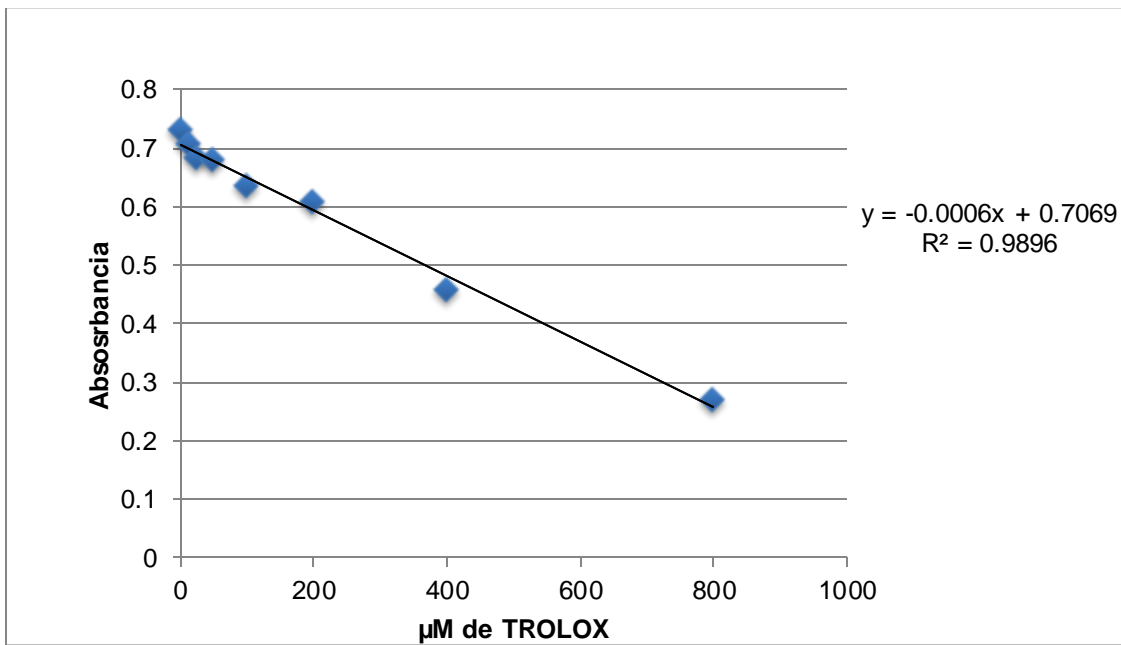


Figura C 2. Curva de calibración de ensayo ABTS.

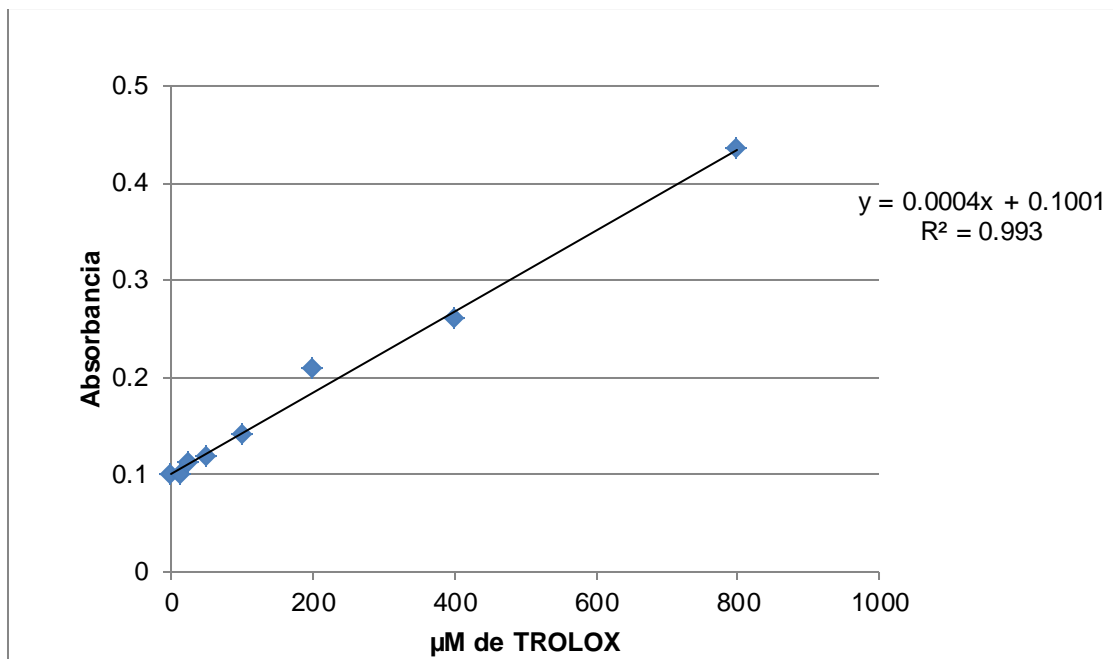


Figura C 3. Curva de calibración de ensayo FRAP.

ANEXO D. MEDIO DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO DE *C. elegans*

D1. Medio de crecimiento de nemátodos (NGM)

Cloruro de sodio (NaCl)	2 g/L
Peptona de caseína	4 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) 1M	3 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄) 1M	0.5 g/L
*Colesterol	1 mL
Agar	20 g/L
*Colesterol en etanol a una concentración de 5 mg/mL	

D2. Medio M9

Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) 1M	3 g/L
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) 1M	6 g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g/L
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	1 mL

ANEXO E. PERFIL DE COMPUESTOS POR HPLC

Tabla E 1. Tiempo de retención de estándares.

ESTÁNDAR	TR (min.)
Ácido Quínico	2.05
Ácido 3,4 Dihidroxi benzoico	2.75
Ácido Gálico	4.21
Ácido p- Hidroxi benzoico	15.99
Ácido Clorogénico	23.69
Ácido Cafeico	24.00
Ácido p-Cumárico	25.59
Ácido Ferúlico	26.30
Ácido Rosmarínico	28.767
Ácido Transcinámico	34.35

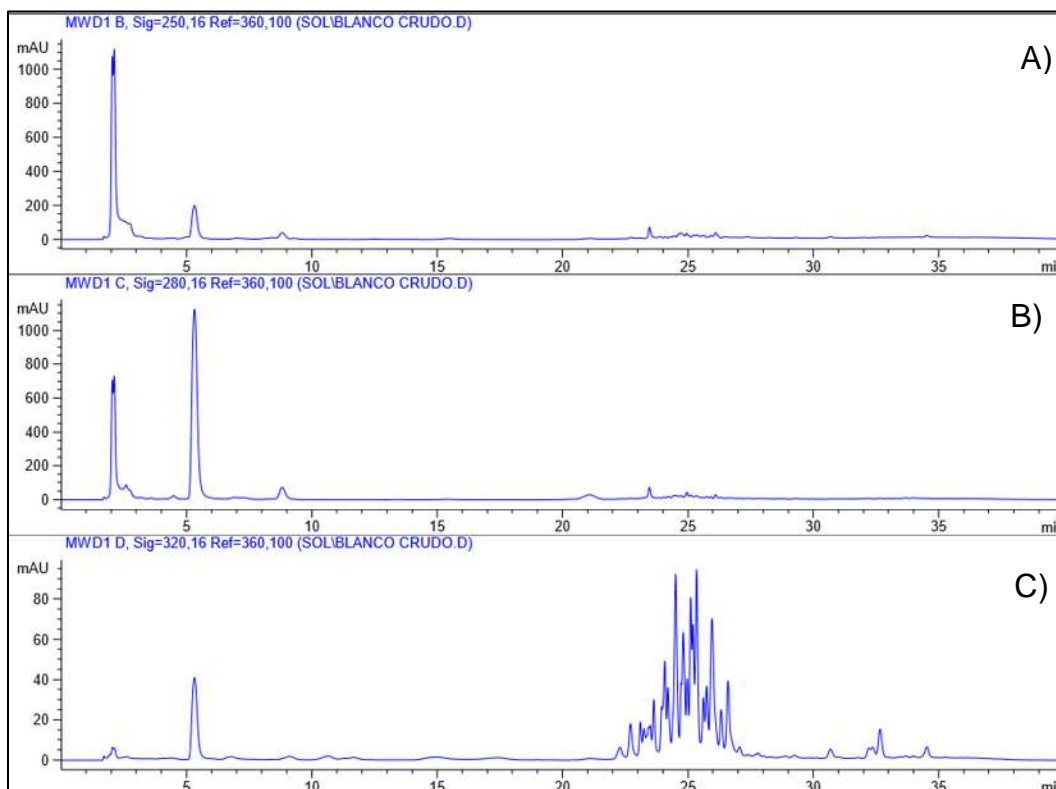


Figura E 1. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de Alubia blanca a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm C) 320 nm.

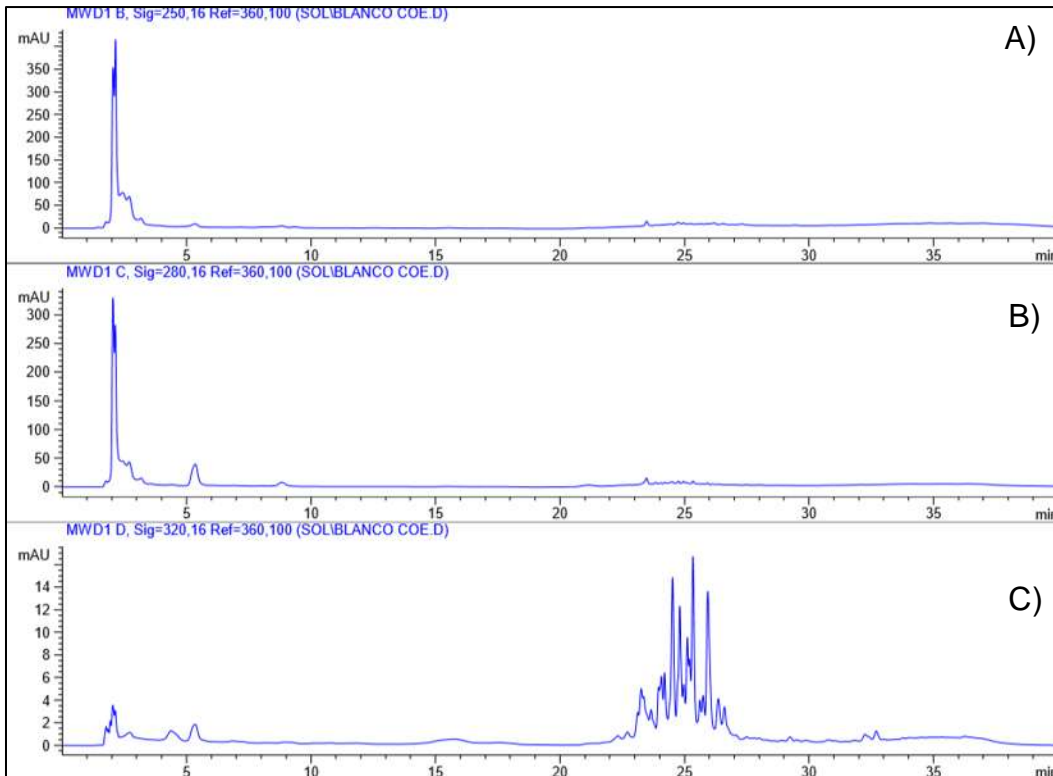


Figura E 2. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla express a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

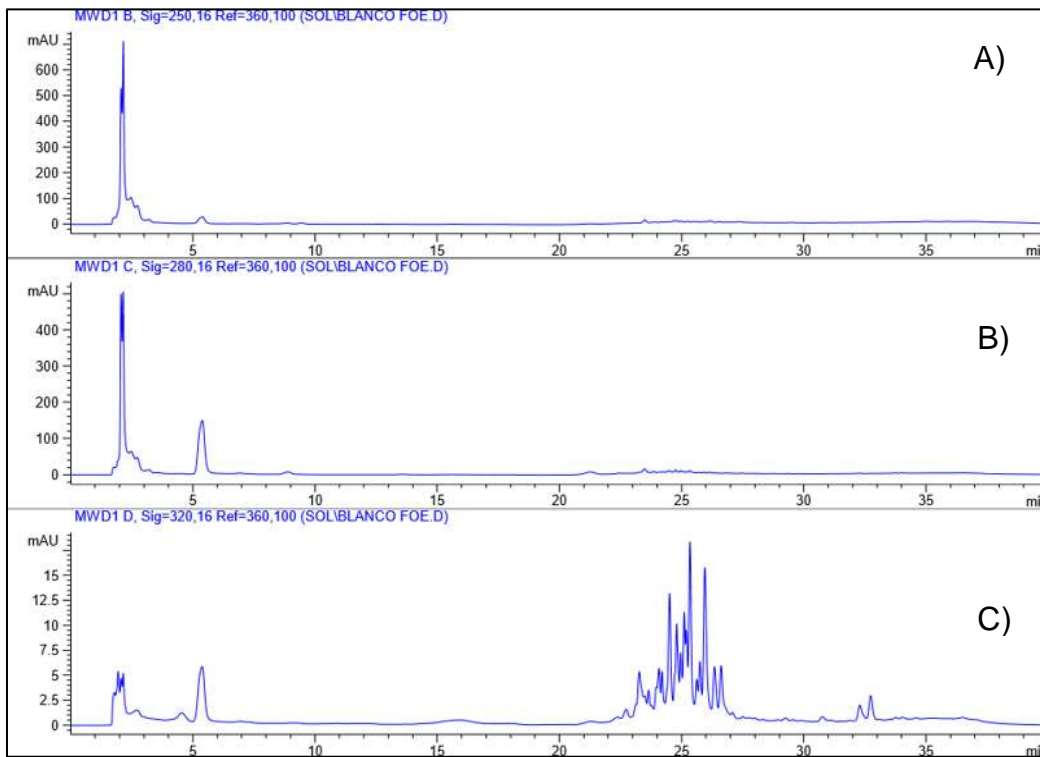


Figura E 3. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla express y frita a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

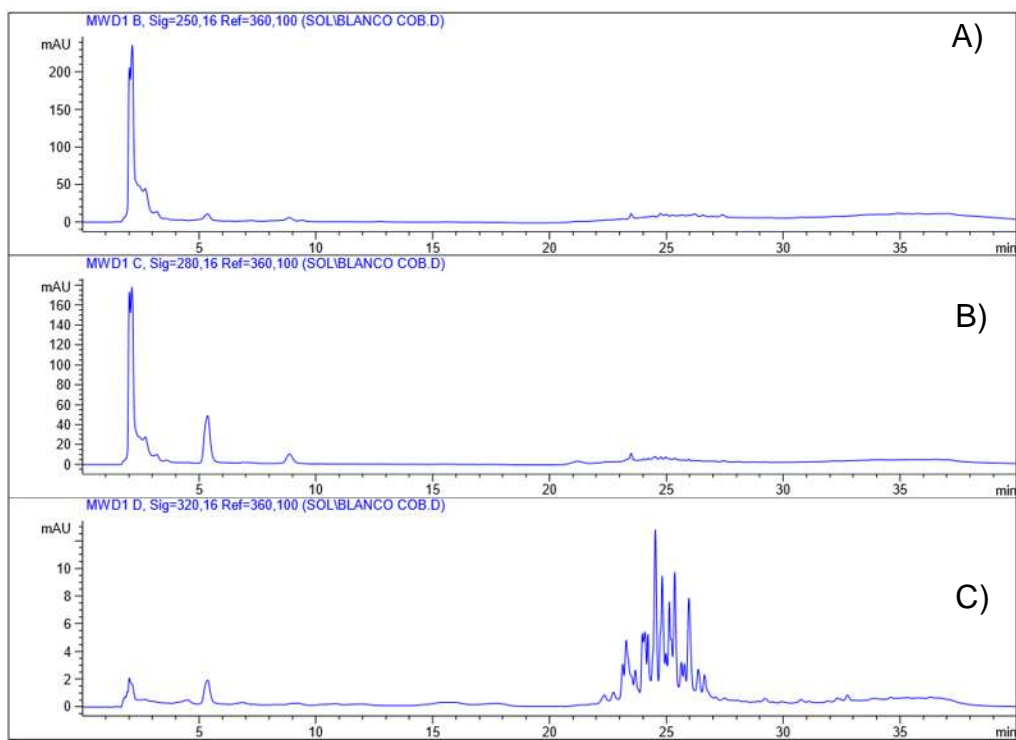


Figura E 4. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla de barro a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

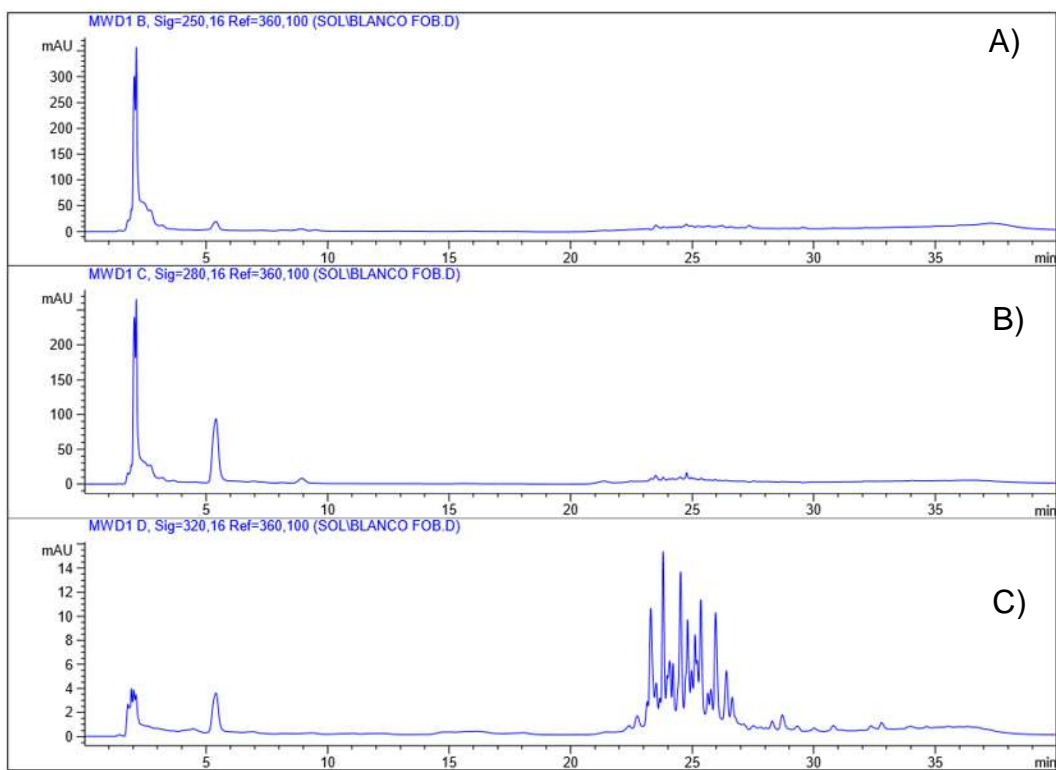


Figura E 5. Cromatograma de extracto obtenido de semilla de Alubia blanca cocida en olla de barro y frita a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

Tabla E 2. Perfil de compuestos del extracto metanólico de Alubia blanca.

SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)					COMPUESTO
		CRUDO	COCIDO (OLLA EXPRESS)	FRITO (OLLA EXPRESS)	COCIDO (OLLA DE BARRO)	FRITO (OLLA DE BARRO)	
1	2.036	12.2	29.0	24.5	18.9	15.3	Ácido Quínico
2	2.128	22.5	35.2	32.4	45.7	42.8	
3	2.627	4.1	9.2	7.2	7.2	5.8	
4	5.358	40.2	9.4	24.0	12.8	21.2	
5	8.863	3.0	2.0	1.3	2.9	2.1	
6	21.205	2.9	1.6	2.3	1.8	1.9	
7	22.280	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
8	22.698	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
9	23.110	0.3	0.3	0.1	0.3	0.0	
10	23.262	0.2	0.5	0.5	1.0	1.2	
11	23.459	0.2	0.6	0.2	0.0	0.0	
12	23.647	0.5	0.5	0.2	0.4	0.2	Ácido Clorogénico
13	24.097	0.8	0.4	0.3	0.6	0.6	Ácido Cafeico
14	24.384	0.6	0.6	0.3	0.5	0.5	
15	24.684	1.8	1.8	0.9	1.6	1.6	
16	24.801	1.0	1.5	0.7	1.3	1.1	
17	24.962	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	
18	25.107	1.0	0.8	0.5	0.7	0.7	
19	25.192	0.8	0.5	0.4	0.3	0.4	
20	25.341	1.6	1.7	1.1	1.1	1.2	
21	25.619	0.5	0.4	0.2	0.3	0.3	Ácido p-Cumárico
22	25.749	0.6	0.4	0.3	0.3	0.3	
23	25.946	1.8	1.9	1.2	1.2	1.2	
24	26.354	0.5	0.6	0.4	0.4	0.7	Ácido Ferúlico
25	26.611	1.0	0.6	0.5	0.4	0.5	
26	30.672	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
27	32.668	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
28	34.516	0.19	0.0	0.0	0.0	0.0	

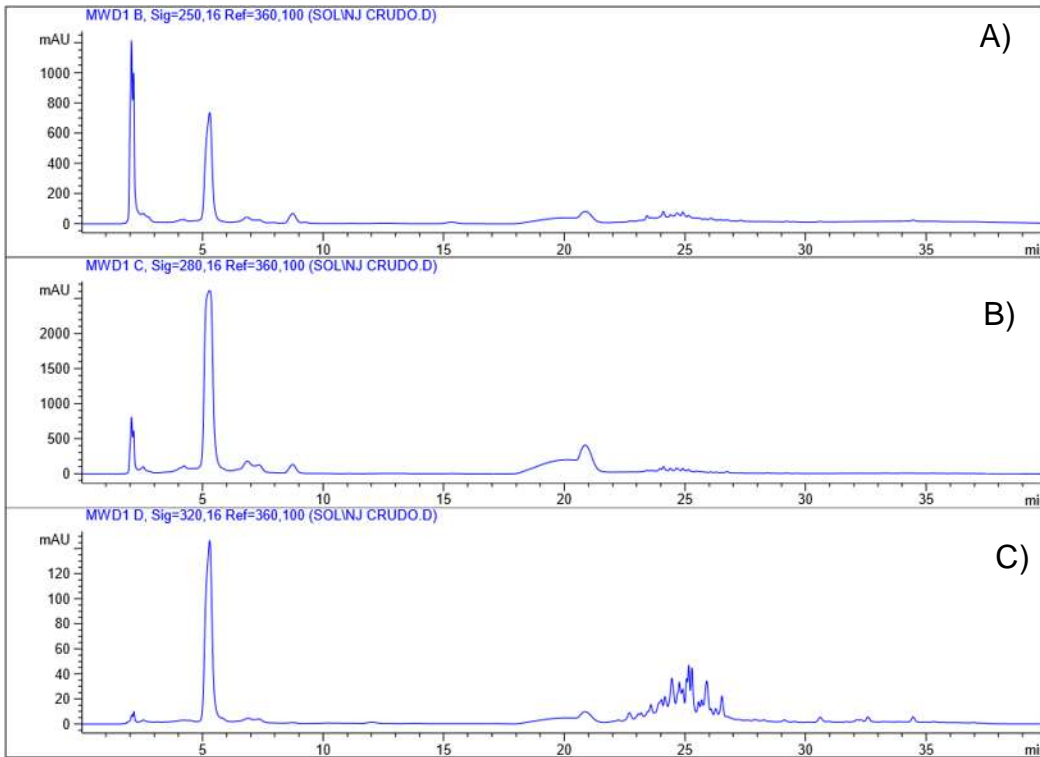


Figura E 6. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Negro Jamapa a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

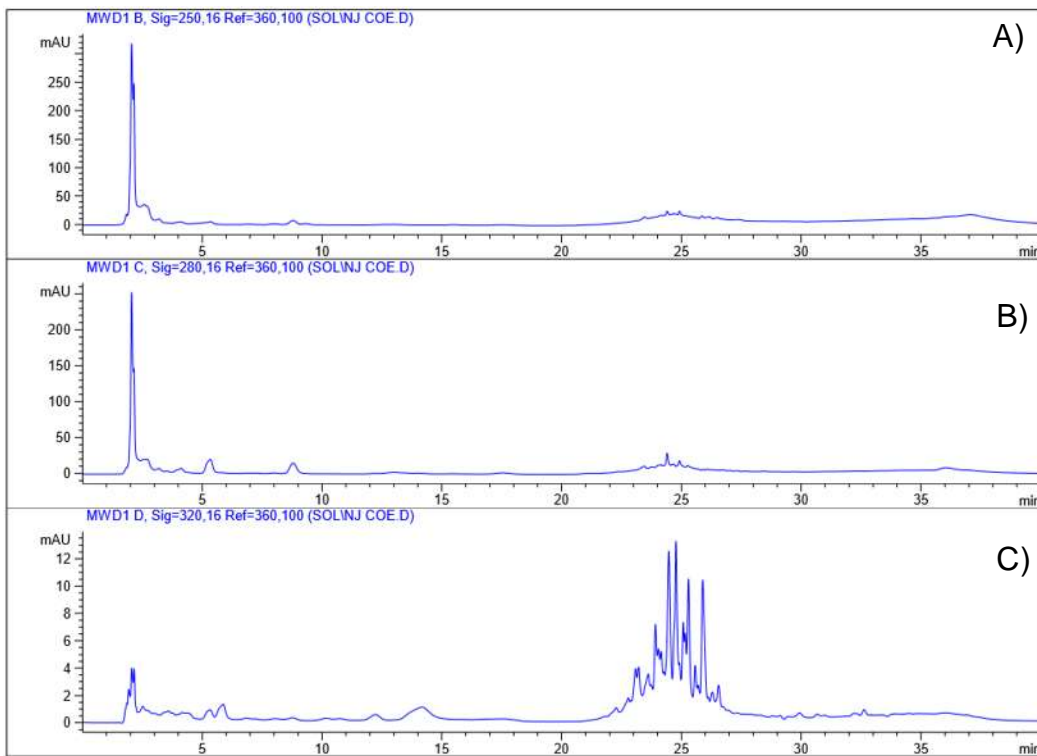


Figura E 7. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla express a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

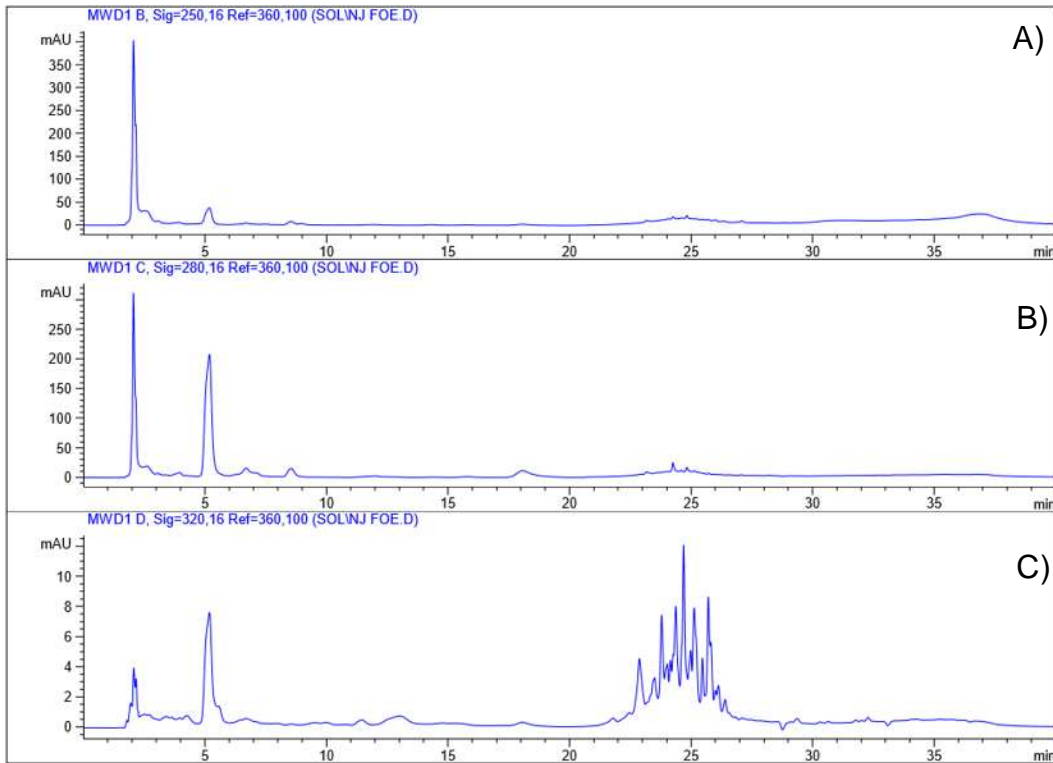


Figura E 8. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla express y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

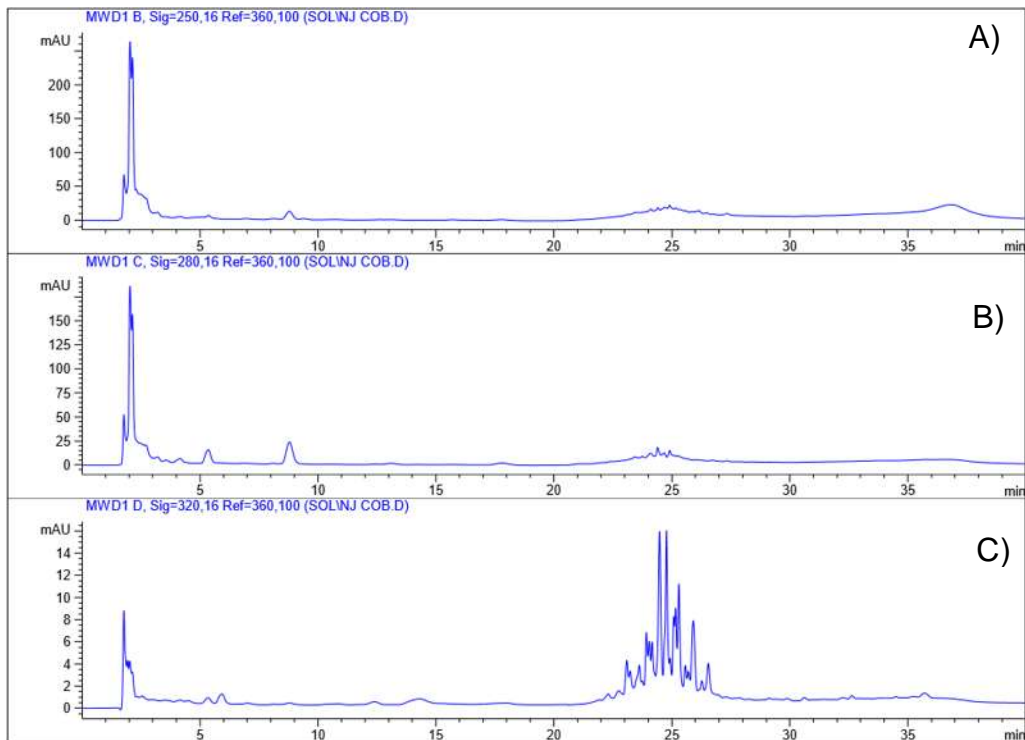


Figura E 9. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla de barro a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

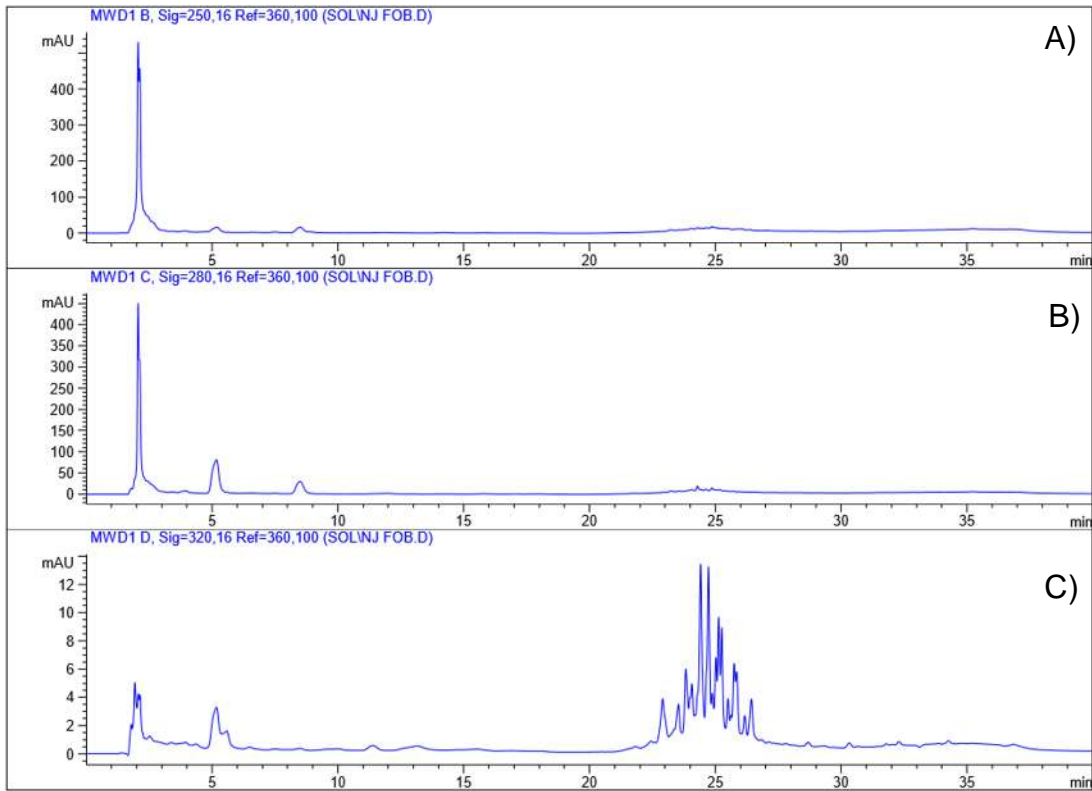


Figura E 10. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Negro Jamapa cocido en olla de barro y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

Tabla E 3. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Negro Jamapa.

SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)					COMPUESTO
		CRUDO	COCIDO (OLLA EXPRESS)	FRITO (OLLA EXPRESS)	COCIDO (OLLA DE BARRO)	FRITO (OLLA DE BARRO)	
1	2.046	7.7	35.1	32.1	40.6	31.4	Ácido Quínico
2	2.131	5.0	22.6	12.6	31.4	39.3	
3	5.261	60.9	27.7	45.5	5.0	17.3	
4	6.817	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	
5	8.666	2.6	11.8	3.3	10.0	6.5	
6	20.857	15.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
7	22.878	0.0	0.3	0.8	0.6	0.5	
8	23.561	0.1	0.2	0.7	0.8	0.4	
9	23.886	0.3	0.2	0.7	0.8	0.5	Ácido Cafeico
10	24.431	0.4	0.5	0.9	2.7	1.2	
11	24.733	0.3	0.5	1.2	2.4	1.0	
12	25.075	0.2	0.2	0.0	0.8	0.5	
13	25.142	0.3	0.1	1.0	0.9	0.0	
14	25.274	0.3	0.3	0.0	1.5	0.5	
15	25.540	0.1	0.1	0.3	0.4	0.0	Ácido p-Cumárico
16	25.842	0.3	0.4	0.7	1.4	0.3	
17	26.147	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	
18	26.369	0.2	0.1	0.0	0.6	0.3	Ácido Ferúlico
19	30.595	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
20	32.574	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
21	34.448	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	

A)

B)

C)

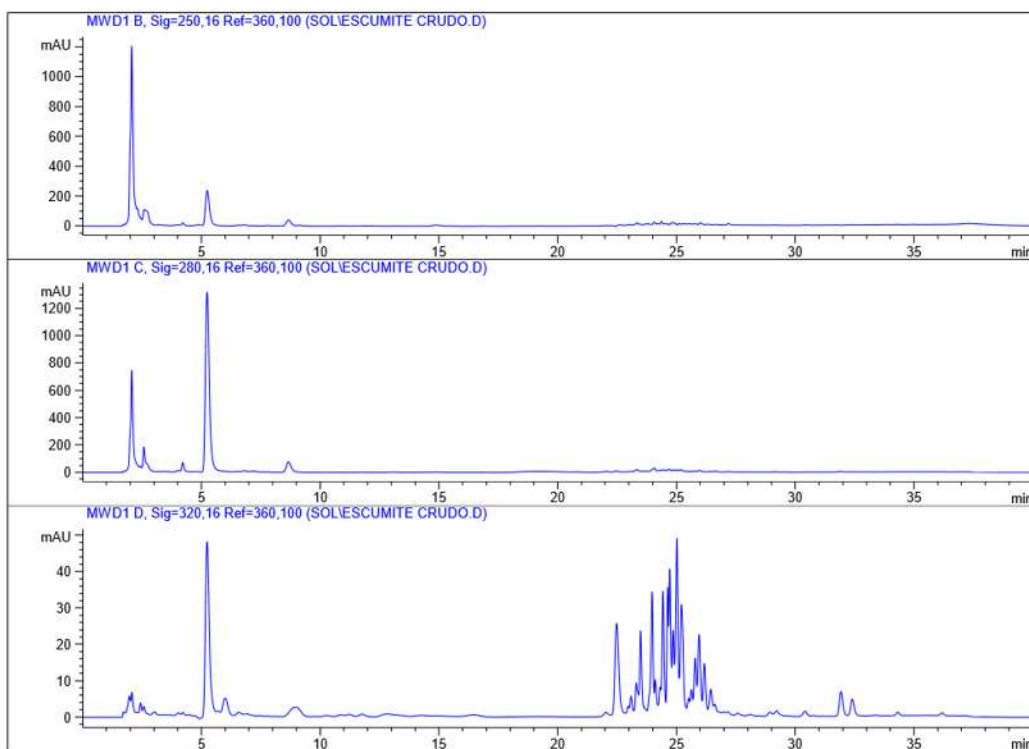


Figura E 11. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Escumite a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

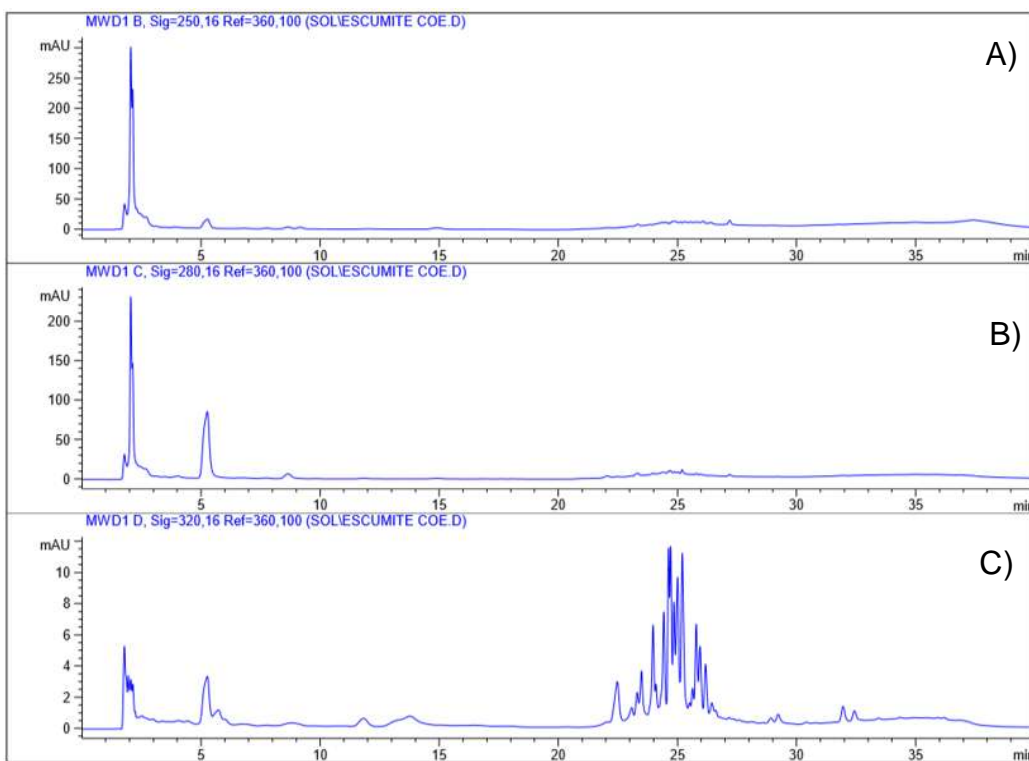


Figura E 12. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla express a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

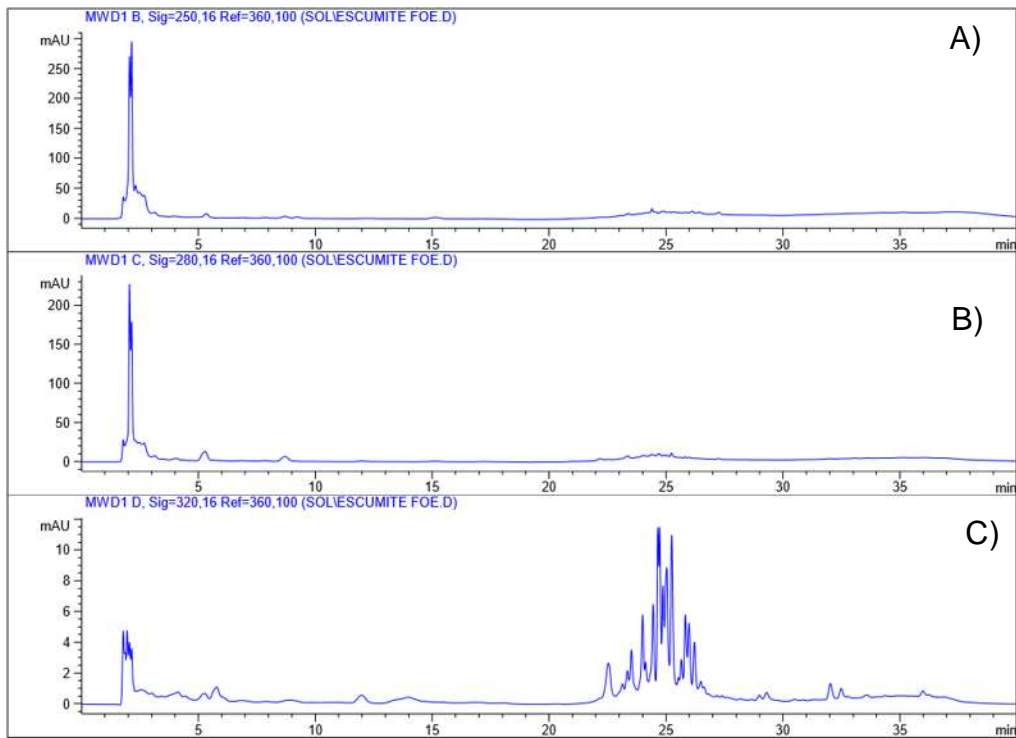


Figura E 13. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla express y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

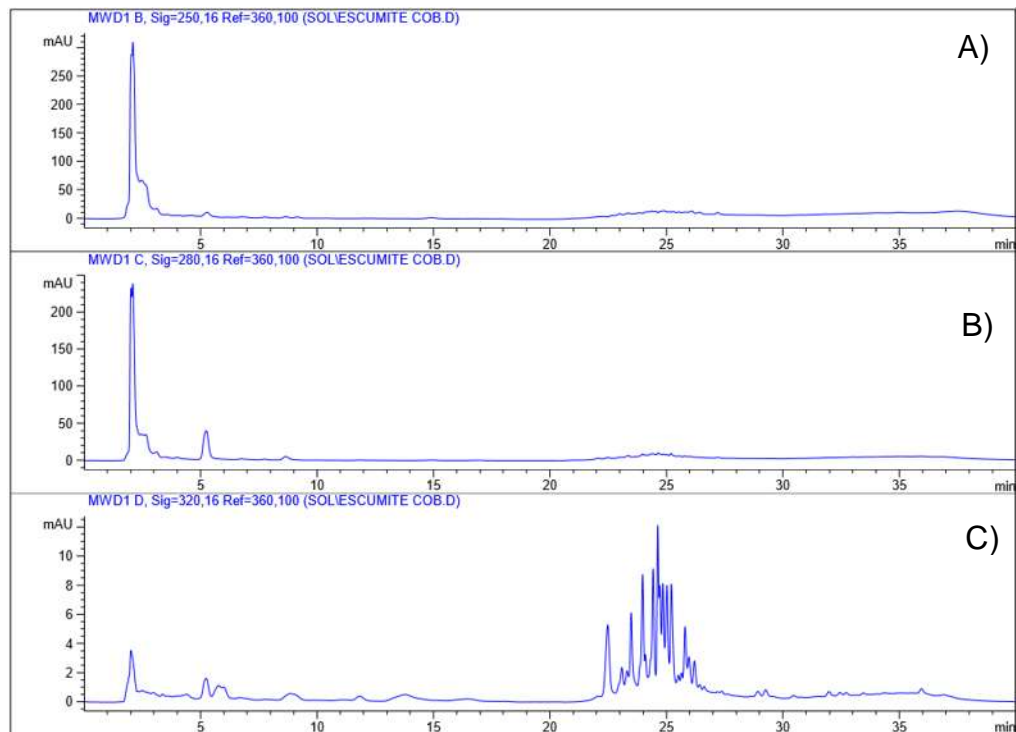


Figura E 14. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla de barro a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

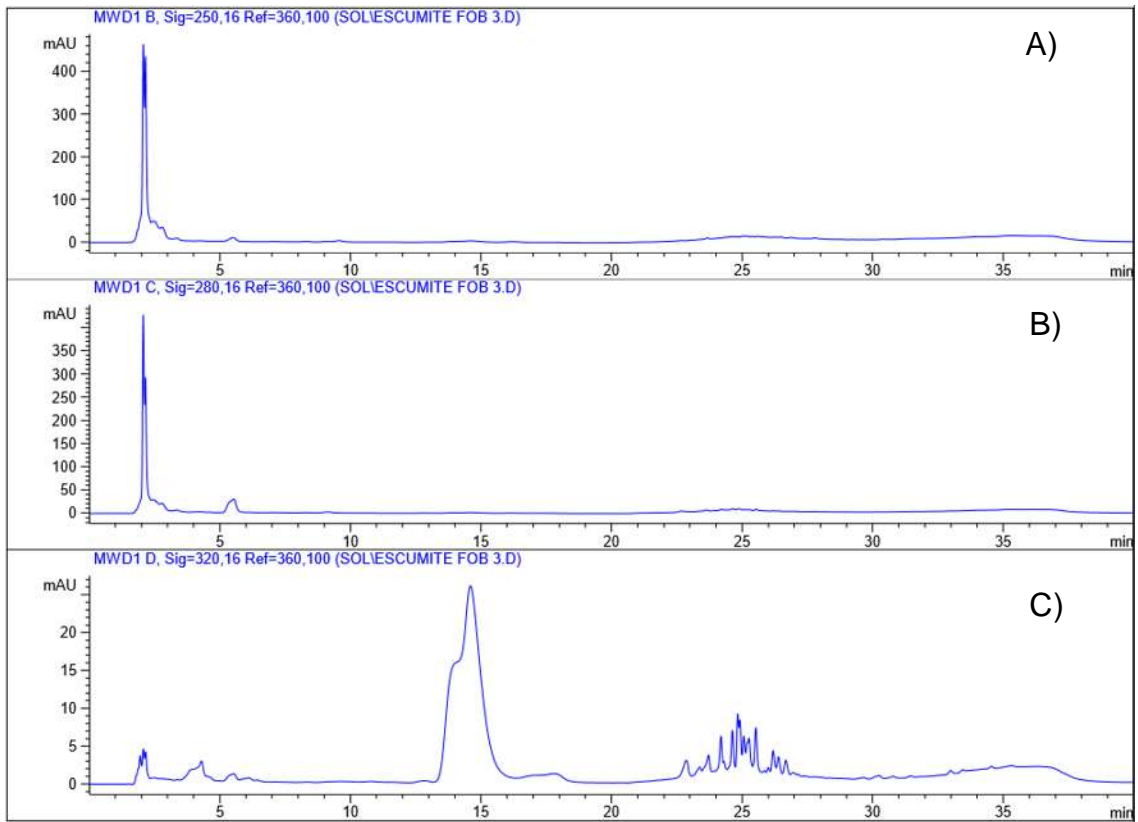


Figura E 15. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Escumite cocido en olla de barro y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

Tabla E 4. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Escumite.

SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)					COMPUESTO
		CRUDO	COCIDO (OLLA EXPRESS)	FRITO (OLLA EXPRESS)	COCIDO (OLLA DE BARRO)	FRITO (OLLA DE BARRO)	
1	2.039	31.6	31.4	35.8	26.0	54.1	Ácido Quínico
2	2.119	0.1	23.2	30.6	51.2	23.2	
3	2.612	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
4	4.093	1.9	1.8	2.6	1.7	2.6	Ácido Gálico
5	5.280	49.0	30.3	16.0	10.5	11.9	
6	8.712	3.7	2.6	3.0	1.5	1.0	
7	22.521	1.0	0.8	0.9	1.1	0.8	
8	22.979	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
9	23.315	0.2	0.3	0.4	0.3	0.0	
10	23.511	0.5	0.6	0.7	0.8	0.6	
11	23.996	0.7	0.9	1.0	1.0	0.9	Ácido Cafeico
12	24.447	0.7	1.1	1.2	1.2	1.1	
13	24.622	0.5	1.0	1.1	0.9	0.0	
14	24.845	0.4	0.9	0.9	0.7	0.7	
15	25.003	1.0	1.4	1.7	0.9	0.7	
16	25.198	0.9	1.7	1.7	1.0	1.0	
17	25.670	0.3	0.8	0.8	0.6	1.0	Ácido p-Cumárico
18	25.949	0.6	0.7	0.8	0.4	0.0	
19	26.152	0.3	0.5	0.7	0.3	0.5	
20	26.335	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	Ácido Ferúlico
21	31.918	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
22	32.394	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	

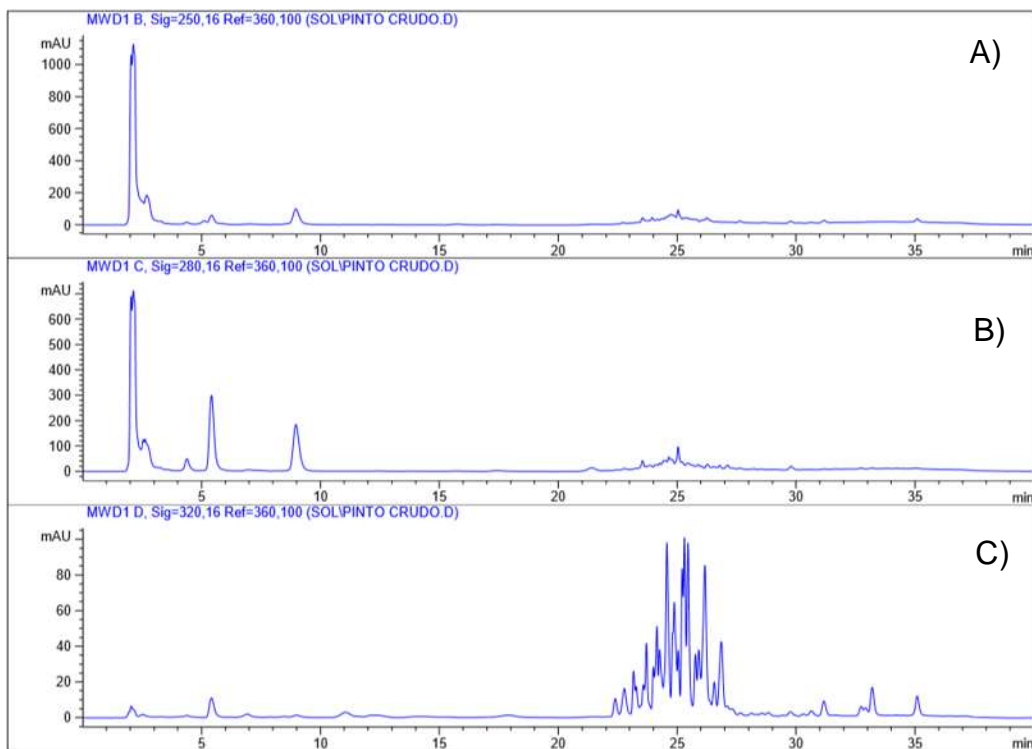


Figura E 16. Cromatograma de extracto obtenido de semilla cruda de frijol Pinto a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

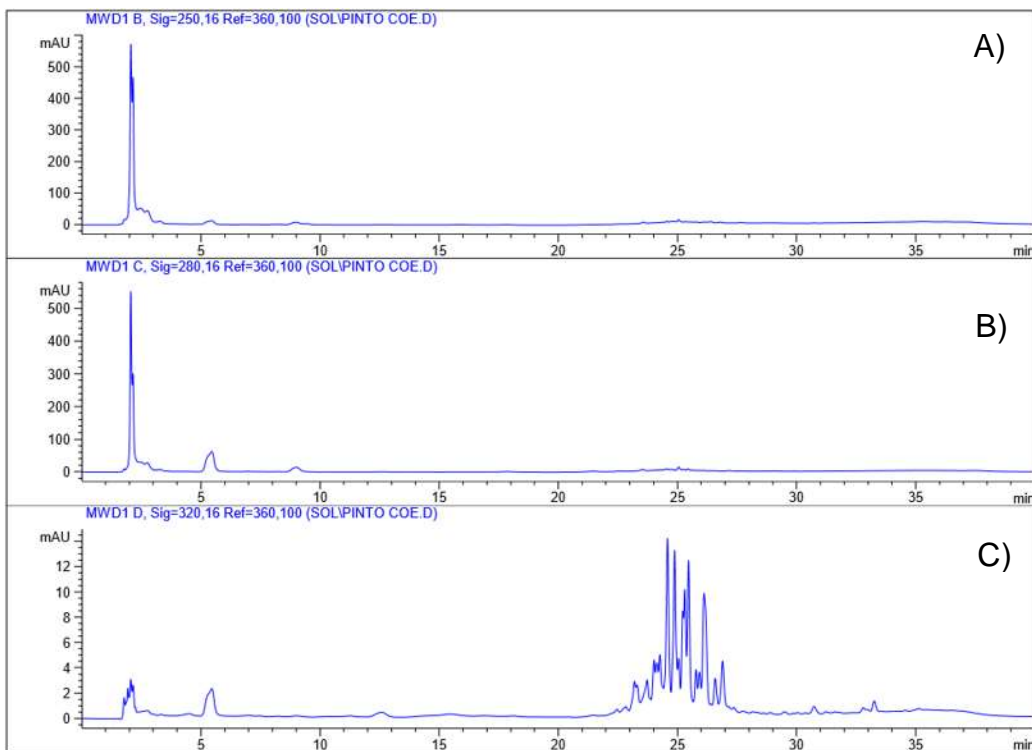


Figura E 17. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla express a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm..

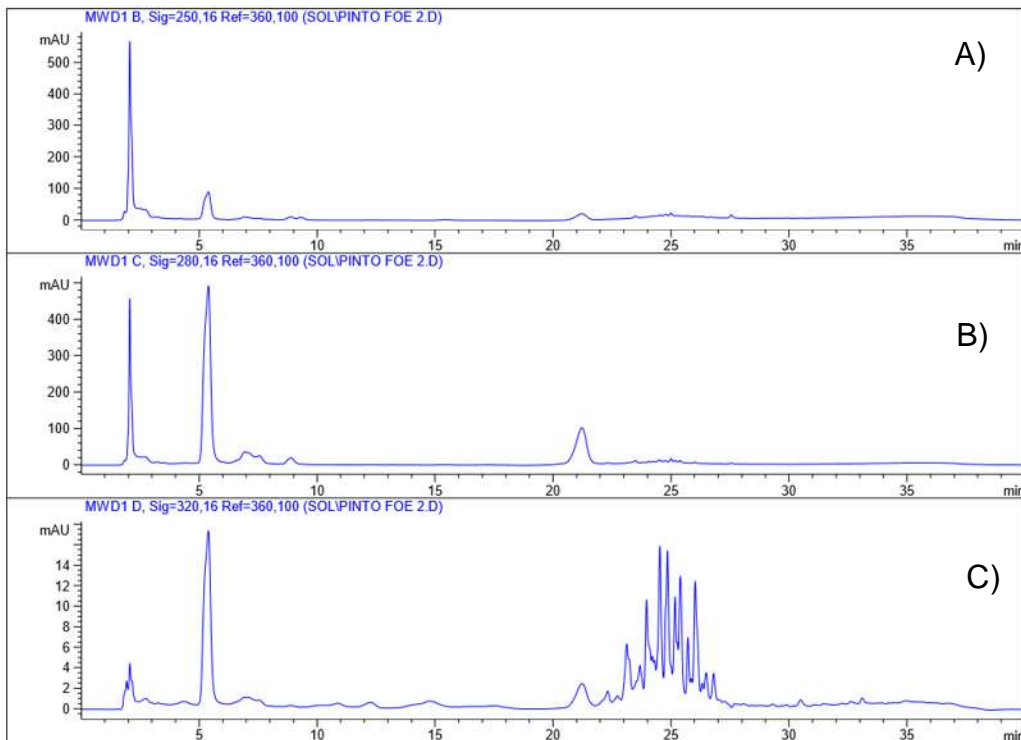


Figura E 18. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla express y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

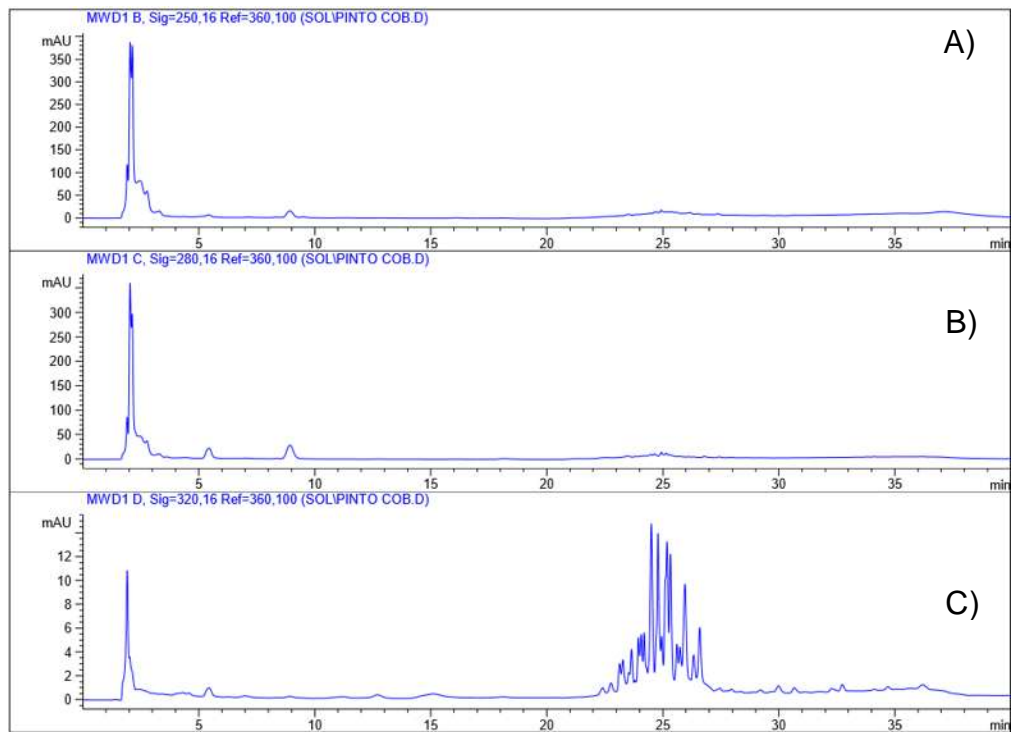


Figura E 19. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla de barro a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

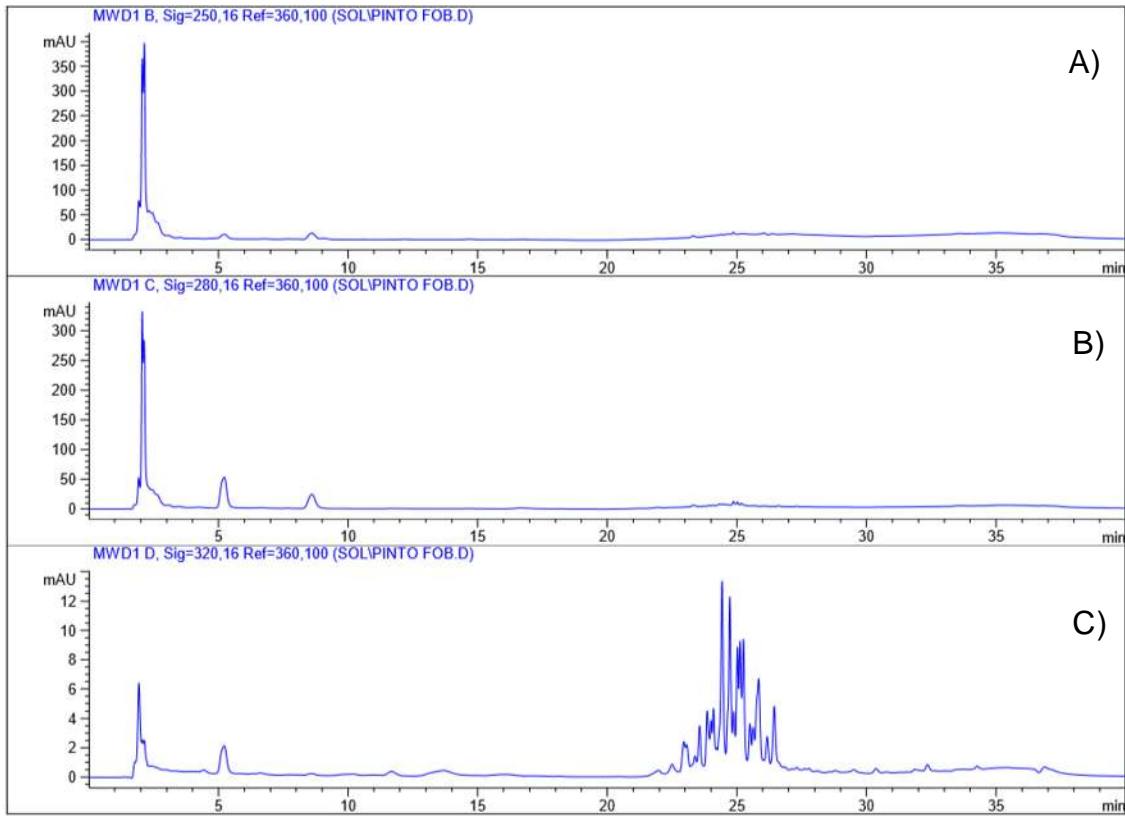


Figura E 20. Cromatograma de extracto obtenido de frijol Pinto cocido en olla de barro y frito a las siguientes longitudes de onda A) 250 nm, B) 280 nm, C) 320 nm.

Tabla E 5. Perfil de compuestos del extracto metanólico de frijol Pinto.

SEÑAL	TR (min.)	ABUNDANCIA RELATIVA (%)					COMPUESTO
		CRUDO	COCIDO (OLLA EXPRESS)	FRITO (OLLA EXPRESS)	COCIDO (OLLA DE BARRO)	FRITO (OLLA DE BARRO)	
1	2.043	14.5	35.7	32.5	29.2	27.4	Ácido Quínico
2	2.128	35.4	27.1	0.0	34.2	35.7	
3	2.701	8.6	7.7	6.1	10.9	7.4	
4	4.396	2.0	0.0	0.0	1.3	0.0	Ácido Gálico
5	5.346	11.6	15.2	49.3	5.2	14.7	
6	8.819	8.8	3.8	3.4	7.8	8.0	
7	21.413	1.0	1.1	0.0	0.0	0.0	
8	22.404	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	
9	22.771	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	
10	23.110	0.4	0.3	0.5	0.2	0.2	
11	23.271	0.3	0.2	0.1	0.3	0.0	
12	23.626	0.7	0.5	0.5	0.3	0.4	Ácido Clorogénico
13	24.023	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	Ácido Cafeico
14	24.145	0.9	0.3	0.1	0.5	0.4	
15	24.316	0.8	0.5	1.4	0.0	0.0	
16	24.548	2.2	1.3	0.0	1.5	0.0	
17	24.835	0.4	1.2	0.3	1.3	0.4	
18	25.006	0.5	0.3	0.5	0.3	0.7	
19	25.183	1.0	0.5	0.6	1.5	0.8	
20	25.275	1.4	0.7	0.6	1.0	0.9	
21	25.514	1.8	1.0	0.3	0.3	0.3	Ácido p-Cumárico
22	25.722	0.6	0.3	1.5	0.3	0.3	
23	25.897	0.7	0.3	0.0	1.1	1.1	
24	26.183	2.4	1.2	0.5	0.3	0.3	
25	26.363	0.4	0.3	0.4	0.6	0.6	Ácido Ferúlico
26	26.855	1.2	0.5	0.1	0.0	0.0	
27	29.750	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
28	30.635	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
29	31.161	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
30	33.192	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
31	35.083	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	