

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOSEPARACIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE
FRIJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris* L.), MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.)
Y JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

MA. CATALINA ROSALES LÓPEZ
9917718
catyros@hotmail.com



II semestre-2003



OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOSEPARACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL NEGRO (MX 332 Y PERLA), MAÍZ AZUL Y JAMAICA

Realizado en:

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
(ITESM)

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

MONTERREY, MÉXICO

2003

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE
BIOSEPARACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL
NEGRO (*Phaseolus vulgaris* L.), DE JAMAICA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) Y MAIZ AZUL (*Zea mays* L.)

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Ma. Catalina Rosales López, como requisito parcial para optar al título de bachiller en Ingeniería en Biotecnología

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

ASESOR EN ITCR
PROFESOR

Dr. MIGUEL ROJAS CHAVES

ASESORA EN ITESM
PROFESORA

Dra. CARMEN HERNÁNDEZ B.

LECTORES (ITCR)

Licda. ELIZABEHT ARNÁEZ S.

MSc. SILVANA ALVARENGA V.

ESTUDIANTE

MA. CATALINA ROSALES LÓPEZ

Cartago, 26 enero de 2004

DEDICATORIA

Este proyecto como parte importante de mi vida profesional, es dedicado a todos aquellos que junto conmigo lo hemos hecho posible:

- Primero a mis profesores y compañeros del ITCR, quienes me han enseñado todo lo que en este proyecto he puesto en práctica.
- A los doctores del ITESM por aceptarme como parte importante en uno de sus proyectos de investigación y a los compañeros de trabajo del Centro de Biotecnología que me enseñaron lo el trabajo en el laboratorio.
- A mi familia en Costa Rica, mi novio y mi familia en México quienes con su cariño me demostraron su apoyo.
- Y todos aquellos que se acordaron de mí, y me apoyaron durante el tiempo de la realización de mi proyecto.

AGRADECIMIENTOS

“Es muy importante el crecimiento y desarrollo profesional hoy en día, hay mucha competencia”

- Gracias a Dios por nunca dejarme sola. Gracias por permitir que en todo momento las cosas salieran bien. Y especialmente gracias por que haya sido tu voluntad el que yo realizara este trabajo.
- Les agradezco a mis padres y hermanos por enseñarme que la vida es una lucha constante y que el bienestar del mundo depende de nosotros, nuevas generaciones.
- Gracias a mi novio que con sus preocupaciones y ánimos, en cada llamada, me demostraba su apoyo. Gracias por el simple hecho de estar. Gracias a todos que como él, me dijeron palabras de aliento, me apoyaron y me dieron ánimos para seguir adelante.
- Gracias a la familia López Ramírez por abrirme las puertas de sus hogares y de sus corazones, los quiero mucho.
- Y muchísimas gracias a cada uno de los compañeros del laboratorio del ITESM, quienes me ayudaron a sentirme bien. Gracias por su amistad y ayuda.

EPÍGRAFE

El minuto que se vive es el más importante en la vida, dondequiera que te encuentres.

Pon atención en lo que estás haciendo.

El ayer ya se te fue de las manos.

El mañana no ha llegado aún.

Vive el momento presente, porque tu futuro depende de él.

No desaproveches las oportunidades del momento, sácale toda la utilidad que puedas, para tu perfección.

Cada uno de nosotros es responsable de su destino.

Supera las dificultades, vence los obstáculos y edifica tu vida.

Aprende a vivir eternamente: tratando de estudiar y aprender cosas útiles y provechosas, para ti y para el prójimo.

Sé fiel al cumplimiento de los deberes, trabaja con esmero y amor cada proyecto, aunque parezca insignificante.

Cualquier cosa que se haga, por pequeña que sea, es un paso adelante en el progreso.

Tú eres el único que decide hasta donde quiere llegar.

C. Torres Pastorino

RESUMEN

Existe un gran interés por los compuestos fenólicos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones en enfermedades cardiovasculares, inhibición de células cancerígenas y colesterol. La gran mayoría de los compuestos fenólicos son considerados fitoquímicos y metabolitos secundarios. Hoy en día se realizan estudios para determinar su efecto terapéutico; determinando sus principios activos para curar enfermedades.

La idea principal de este proyecto fue separar, estos compuestos, de algunas plantas que los contienen, optimizando su proceso de bioseparación. Se extrajeron los compuestos fenólicos de dos variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris L.*) previamente seleccionados, así como del maíz azul (*Zea mays L.*) y de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*).

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Centro de Biotecnología, del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, México, bajo la supervisión de la Dra. Carmen Hernández Brenes. En un período de junio a diciembre del 2003.

Para la bioseparación se utilizó el método de fraccionamiento por solubilidad, el cual es una técnica sencilla y rápida para la separación de los grupos más comunes de compuestos fenólicos por solubilidad a diferentes reactivos.

La primera fracción de acetona, permitió la separación de los compuestos fenólicos, los carbohidratos, proteínas y lípidos que contienen las cáscaras del frijol negro, el maíz azul molido y la flor de la jamaica. Posteriormente, en la extracción con éter, se retiraron los lípidos, carotenos y las proteínas separados en la fracción anterior. Se dio la extracción gracias a que los componentes de las muestras son insolubles en éter, permitiendo su separación de los compuestos

fenólicos totales los cuales son solubles a este reactivo (Jaworski, and Lee, 1987).

Posteriormente se determinó la concentración de fenólicos totales solubles presentes en las diferentes fracciones, obtenido por la prueba de Folin. Igualmente la concentración de antocianinas totales por la prueba de pH diferencial, el cual consiste en hacer lecturas espectrofotométricas con buffers de diferente pH.

Como resultado se obtuvo que la jamaica es la muestra de las analizadas, con mayor contenido de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas. Del mismo modo se observaron diferencias entre las dos variedades de frijol, en cuanto el contenido de antocianinas e isoflavonas. El maíz azul contiene gran cantidad de antocianinas responsable de su color característico.

Se puede concluir que la técnica de fraccionamiento por solubilidad, permite la separación de los compuestos fenólicos. Y conforme se va realizando el fraccionamiento las concentraciones de los compuestos van disminuyendo en cada fracción. Además se comprobó que existen diferentes tipos de compuestos, antocianinas e isoflavonas en cada especie, además se determinó la cantidad presente por muestra.

ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN	PÁGINA
Constancia de la defensa pública del proyecto de graduación	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Epígrafe	iv
 CONTENIDO	
Resumen	v
Índice General	vii
Índice de Cuadros	xi
Índice de Figuras	xii
 I. INTRODUCCIÓN	
	1
A. Centro de Biotecnología del ITESM	3
B. Justificación	5
C. Objetivos del Proyecto	6
C.1 Objetivo General	6
C.2 Objetivos Específicos	6
 II. REVISIÓN DE LITERATURA	
	7
1. Fitoquímicos	7
1.1 Polifenoles	8
2. Compuestos Fenólicos	8
2.1 Flavonoides	13

2.2	Antocianinas	16
2.3	Isoflavonas	18
3.	Antioxidantes	21
3.1	Nutrientes y sustancias no nutritivas que actúan como antioxidantes	22
3.1.1.	Vitaminas	22
3.1.2.	Minerales	23
3.1.3.	Aminoácidos	24
3.1.4.	Colorantes Vegetales	24
3.1.5	Enzimas Antioxidantes	25
4.	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	25
5.	Maíz (<i>Zea mays</i>)	27
6.	Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	29
7.	Cromatografía de micro extracción en fase reversa	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
1.	Caracterización física de doce variedades de frijol negro (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)	33
2.	Evaluación de eficiencia de diferentes solventes para la extracción de compuestos fenólicos	34
3.	Extracción de compuestos fenólicos por fraccionamiento	35
3.1	Extracción con solución de acetona:agua	35
3.2	Extracción con éter etílico	36
3.3	Fraccionamiento	36
3.4	Extracción y concentración en metanol	37
4.	Determinación de compuestos fenólicos totales	38
5.	Determinación de antocianinas totales	38

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. Selección de las variedades de frijol negro a analizar	40
2. Evaluación de la extracción con diferentes solventes	41
3. Fraccionamiento	43
3.1 Cuantificación de fenólicos totales	43
3.2 Cuantificación de antocianinas totales	47
V. CONCLUSIONES	52
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. BIBLIOGRAFÍA	55
VIII. ANEXOS	60
1. Clasificación de compuestos fenólicos	61
2. Columna de fase reversa (Sep Pak)	62
3. Lavados de la extracción de compuestos con diferentes solventes	63
4. Resultado de la extracción de compuestos fenólicos, después de los lavados con diferentes solventes	64
5. Secuencia de los reactivos utilizados en el Sep Pak, en la técnica del fraccionamiento	65
6. Esquema del fraccionamiento	66
7. Resultados de la coloración de cada fracción	68
8. Fórmulas para la determinación de fenólicos totales	69
9. Fórmulas utilizadas para la cuantificación de antocianinas	70

10. Buffers utilizados para la técnica de pH diferencial	71
11. Frijoles en remojo	72
12. Técnica del fraccionamiento, técnica de prueba y error	73
13. Espectrofotómetro y el rotavapor	74
14. Contenido de fenólicos totales en cada una de las muestras	75
15. Contenido de antocianinas en cada una de las muestras	77

ÍNDICE DE CUADROS

NÚMERO	DESCRIPCION	PÁGINA
2.1	Fitoquímicos presentes en algunos alimentos	9
2.2	Tipos de compuestos fenólicos sus átomos y estructura	12
2.3	Tipos de antocianinas y la diferencia entre los grupos R _I y R _{II}	18
2.4	Compuestos fenólicos más comunes presentes en las muestras a analizar	30
3.1	Variedades de frijol negro analizadas	34
4.2	Contenido de fenólicos totales en cada fracción (mg)	50
4.3	Contenido de antocianinas en cada fracción (mg)	51

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	DESCRIPCION	PÁGINA
2.1	Estructura química general de los compuestos fenólicos	10
2.2	Estructura química de los ácidos fenólicos	11
2.3	Estructura química general de los flavonoides	15
2.4	Estructura química de las antocianinas	17
2.5	Estructura química de la Genisteína	19
2.6	Estructura química de la Gliciteína y Daidzeína	20
2.7	Estructura química del estradiol	20
2.8	Frijol negro	27
2.9	Maíz azul	28
2.10	Jamaica	30
4.11	Contenido de antocianinas en cada una de las variedades analizadas	41

4.12	Evaluación del contenido de fenólicos totales extraídos con diferentes solventes	42
4.13	Contenido de fenólicos totales (mg/l), expresados en ácido gálico, en las distintas fracciones	45
4.14	Comparación entre las concentraciones de fenólicos totales de las dos variedades de frijol negro expresados en ácido Gálico	46
4.15	Comparación entre las concentraciones de antocianinas de las dos variedades de frijol negro	47
4.16	Comparación entre las concentraciones de antocianinas de las distintas variedades analizadas	48
4.17	Esquema representativo de la presencia de antocianinas a diferentes valores de pH, leídos a 518nm	49

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos independientemente de cual sea su origen, están compuestos por mucha agua, carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales; estos componentes son necesarios como fuente de energía, así mismo elementos indispensables para el metabolismo (Hoff and Janick, 1975).

Estudios sobre la composición de los alimentos han revelado que estos a la vez contienen otros componentes en pequeñas cantidades como son las vitaminas, colorantes, compuestos fenólicos, entre otros. Muchos de estos componentes pueden ser utilizados para ayudar a mejorar las actividades normales que realiza nuestro cuerpo (Sikorsk, 1997).

Las plantas han estado desde la antigüedad al alcance del ser humano tanto para su alimentación, como para curar enfermedades; por esta última propiedad, son todavía “veneradas” y se transmite el conocimiento de sus virtudes de generación en generación. Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina tradicional.

Los investigadores están analizando y estudiando los efectos terapéuticos vegetales, queriendo precisar, comparar y clasificar los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades. Se consideran de manera arbitraria dos grandes grupos: los metabolitos primarios y los secundarios, dentro de los primarios se incluyen a sustancias de las rutas bioquímicas básicas presentes en toda célula, los secundarios son un grupo amplio de sustancias cuya función se ubica como evolutiva y de adaptación al medio (Sáenz, 2000).

Los metabolitos secundarios tienen propiedades beneficiosas desde el punto de vista fisiológico y farmacológico. En este sentido, se destacan las sustancias

fenólicas (flavonoides, flavanos, resveratrol, tirosol, entre otros.) como compuestos que más interés han despertado en numerosos grupos de investigación dedicados al estudio de diversos aspectos, de estas sustancias, químico, bioquímico, fisiológico, farmacológico, entre otros (IPN CIENCIA, 1998).

Los polifenoles, de las plantas, han llamado la atención de los epidemiólogos, biotecnólogos, químicos, bioquímicos y farmacólogos; debido a su potencial e importancia en la salud y en mecanismos antioxidantes de defensa (Rickard, 1997)

Varios estudios han identificado a los compuestos fenólicos como responsables de propiedades beneficiosas en la salud. Un grupo de profesionales y estudiantes del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), México, están probando la capacidad antioxidante y el efecto inhibitorio de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de células cancerígenas, extraídos de diferentes muestras como el maíz, el frijol y la jamaica (Hernández, 2003).

Los flavonoides, las isoflavonas son tipos de compuestos fenólicos, encontrados en frutas, vegetales, nueces y granos, poseen propiedades biológicas que ayudan a reducir el riesgo de contraer enfermedades (Lock, 1994), (Barret-Connor, 1998). Los investigadores del ITESM reafirman estas afirmaciones (Hernández, 2003). Otra sustancia utilizada como antioxidante contra las enfermedades cardíacas y cancerosas son las antocianinas, pigmentos responsables del color de los alimentos y que protegen a las frutas contra el ataque de los hongos. La mayoría de éstas sustancias beneficiosas se acumulan en las cáscaras de las frutas (Sáenz, 2000).

Los compuestos fenólicos están presentes en las frutas, flores, granos y verduras. Se pueden encontrar varios tipos de ellos en un solo alimento. Por lo que fue necesario optimizar la extracción para luego realizar su análisis y probar

sus efectos por separado; esto a partir de las concentraciones de fenólicos totales, donde se incluyen las isoflavonas, antocianinas y flavonoides.



A. CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA DEL ITESM

El Centro de Biotecnología (CB), del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, México, fue fundado en 1994. El Centro realiza investigaciones enfocadas en las áreas alimentarias, agrícolas, ambientales y farmacéuticas, haciendo uso de microorganismos, enzimas y plantas o animales.

El laboratorio de investigación del Centro de Biotecnología se encuentra en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.

Actualmente en el Centro de Biotecnología del ITESM, se desarrollan procesos biotecnológicos alternativos para la producción de aditivos funcionales, su labor de investigación se enfoca a la identificación de compuestos con potencial para ser utilizados en la prevención y tratamiento de las principales enfermedades que bajan la expectativa y la calidad de vida tales como diabetes, aterosclerosis, hipercolesterolemia, hipertensión, síndrome posmenopáusico y cánceres hormona-dependientes e independientes. Los proyectos de investigación se basan en el aislamiento y purificación de estos compuestos mediante técnicas biotecnológicas sofisticadas para su posterior uso por las industrias de alimentos y farmacéuticas.

Algunas áreas de investigación en el Centro de Biotecnología, combinan bioingeniería y biomedicina, ingeniería de bioreacción, modelos matemáticos de bioprocesos. Así como la Biotecnología de los cereales, tecnología de las enzimas, prebióticos y alimentos fermentados, entre otros.

En el desarrollo del proyecto el equipo de trabajo está integrado por profesionales y estudiantes de maestría, entre los cuales están:

- Carmen Hernández, Ph.D.
- Janethe Gutiérrez, M.Sc
- Mayra Cisneros, M.Sc
- Armando Delfollo, M.Sc
- Ing. BQ Gabriela Ángel
- Q. Isabel García (Encargada del laboratorio)

B. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En los últimos años, la biotecnología junto con la tecnología de alimentos han tratado de obtener la transformación, conservación y aseguramiento de la calidad de los alimentos. Además, se encuentran orientadas a la búsqueda de alimentos similares a productos frescos, libres de aditivos químicos, disponibles todo el año y con características demandadas por los consumidores.

Con la elaboración del presente proyecto se pretendió optimizar la técnica de fraccionamiento por solubilidad, y bioseparar los compuestos fenólicos para posteriores investigaciones, con las cuales se quiso probar la actividad antioxidante de cada uno de ellos, sobre células cancerígenas. Y así llegar a la obtención de productos farmacéuticos a partir de compuestos químicos que contienen algunos alimentos.

Además se quiso cuantificar los compuestos fenólicos en cada fracción, para determinar cual de éstas era la más adecuada en las investigaciones posteriores.

El estudio se realizó a partir de alimentos que son una fuente con potencial nutraceutico, alimentos comunmente consumidos por la mayoría de latinoamericanos y a los cuales pueden tener acceso las diferentes clases sociales, como lo son el frijol, el maíz y la jamaica.

C. OBJETIVOS DEL PROYECTO

C.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el protocolo de fraccionamiento con solventes orgánicos que permitan la extracción de los compuestos fenólicos, a partir de dos variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y del maíz azul (*Zea mays* L.) y para llevar a cabo la cuantificación de los fenólicos totales y de las antocianinas presentes en los extractos.

C.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar las variedades de frijol negro que se utilizarán en el proceso de fraccionamiento por solubilidad.
- Evaluar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos utilizando diferentes solventes orgánicos.
- Extraer y separar de compuestos fenólicos por la técnica de fraccionamiento a partir dos variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), granos de maíz azul (*Zea mays* L.) y la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).
- Caracterizar y cuantificar de dichos compuestos por técnicas espectrofotométricas.
- Comparar de forma cuantitativa los compuestos fenólicos extraídos de las diferentes muestras (frijol, maíz y jamaica).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. LOS FITOQUÍMICOS

Las frutas y verduras son buenas para la salud ya que contienen diversas vitaminas, minerales y fibra. Desde hace algunos años, se sabe que además de estos nutrimentos, aportan al organismo otras sustancias a las que se les ha denominado, fitoquímicos o fitonutrientes, las cuales han demostrado tener efectos positivos sobre la salud por lo que son estudiados por un gran número de científicos (Avilés, 2002).

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios porque no ejercen una función directa en las actividades fundamentales del organismo vegetal como el crecimiento o la reproducción. Constituyen numerosos componentes químicos, como los carotenoides, que incluyen a los betacarotenos, licopeno o luteína y los polifenoles, donde están los lignanos, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, entre otros (Anexo 1) (Avilés, 2002).

Actualmente se sabe que algunas de estas sustancias actúan modulando la acción de ciertas enzimas. Otras actúan como antioxidantes neutralizando los radicales libres, causantes de enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis y envejecimiento (Avilés, 2002).

No sólo los fitoquímicos son antioxidantes sino también lo son las vitaminas C, E, A y algunos oligoelementos (selenio y manganeso). Algunos polifenoles como las isoflavonas y los lignanos tendrían propiedades estrogénicas que limitarían el desarrollo de cánceres hormonodependientes. Existe evidencia científica que relaciona un alto consumo de frutas y verduras con un menor riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer; responsables de esta acción protectora serían los fitoquímicos (Avilés, 2002) (Cuadro 1).

1.1 LOS POLIFENOLES

Estos pigmentos son muy abundantes en los vegetales a los que dan aromas y colores. Los polifenoles constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios, son de difícil clasificación pero se pueden subdividir en cuatro grandes grupos, primero los ácidos fenólicos, segundo los ligninas, tercero los taninos y por último los flavonoides, que a su vez se dividen en varios subgrupos como flavonas, isoflavonas, antocianinas, entre otros (Martínez *et al*, 2000).

El envejecimiento así como la aparición de algunas enfermedades, se debe al efecto de los "radicales libres". Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que atacan los enlaces de proteínas de los tejidos. Una vez que comienzan a actuar, se activa una reacción en cadena que acaba por destruir totalmente la célula (Sauza y Sáenz, 2000) (Rickard, 1997).

Se puede combatir a los radicales libres consumiendo antioxidantes artificiales, pastillas de vitamina C, vitamina E y betacarotenos; o recurriendo a una alimentación sana (antioxidantes naturales) con altas dosis de verduras, granos y frutas frescas, aceite de oliva y vino tinto (Sauza y Sáenz, 2000).

2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Estos compuestos poseen en común un anillo aromático, con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que se encuentran como glicósidos, combinados con unidades de azúcar (Figura 1). Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Dada su naturaleza aromática muestran, una intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo (Lock, 1994).

Cuadro 1: Fitoquímicos presentes en algunos alimentos

Alimento	Fitoquímicos	Acción
Tomate	Lycopeno	Afecciones cardiacas Cáncer de próstata
Ajo, cebolla, poro	Saponina Alicina	Infecciones El aumento del colesterol Tumores
Zanahorias, verduras verdes oscuras, mango, melocotón, melón	Betacarotenos	Alteraciones pulmonares malignas
Brócoli, coles, col de Bruselas, ajo, cebollas	Isotiocianatos	Cáncer del pulmón
Manzanas, uvas, cebollas	Quercetina	Afecciones cardiacas Evolución celular cancerosa
Fresas, uvas	Ácido elágico	Intoxicación por humo del tabaco
Naranjas, duraznos	Terpeno	Úlceras Cáncer
Brócoli, coles	Indoles	Ciertos tipos de cáncer
Frutas, verduras, soja, cítricos, té verde, vino, cacao	Flavonoides	Afecciones cardiacas Ciertos tipos de cáncer
Frutas, verduras, bayas, nueces, soja, azafrán, aceitunas	Polifenoles	Afecciones cardiacas Ciertos tipos de cáncer

FUENTE: Avilés, R. 2002.

La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante (donador de hidrógeno o electrones, o atrapador de radicales libres). Además, su capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres (Evans and Miller, 1997) (Cuadro 2).

Dentro de ellos existen dos grandes grupos de compuestos fenólicos: los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y los flavonoides (flavonoles, antocianinas y taninos).

La diferencia de estructura entre ambos grupos consisten principalmente en que los ácidos fenólicos tienen un único anillo fenólico, mientras que los flavonoides están formados por dos anillos fenólicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Martínez, sf) (Figuras 1 y 2)

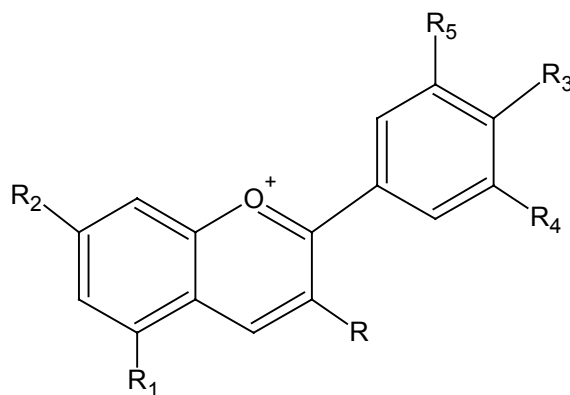


Figura 1. Estructura química general de los compuestos fenólicos

A pesar de que todos presentan una estructura fenólica, núcleo aromático que contiene un grupo hidroxílico libre o sustituido, se diferencian de otros

compuestos que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético.

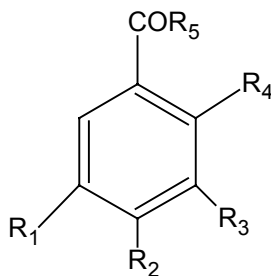


Figura 2. Estructura química de los Ácidos fenólicos

Los flavonoides y los ácidos fenólicos junto con sus ésteres, son genéricamente denominados “compuestos fenólicos” (Bankova et al, 2000). Estos compuestos absorben radiación en la región ultravioleta del espectro electromagnético y protegen de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles (Maldonado, 2002).

Entre las plantas medicinales que poseen ácidos fenólicos se pueden destacar la alcachofa con actividad contra el colesterol, el ortosifón con actividad diurética y la equinácea empleada por sus propiedades inmuno-estimulantes (Tyler, 1994).

La mayoría de compuestos fenólicos cumplen dos condiciones. La primera es que no son intermediarios, ni productos finales de los ciclos metabólicos aceptados como esenciales para los procesos vitales de los organismos que los sintetizan. Y la segunda es que raramente su presencia es universal; normalmente una sustancia se localiza en una o varias especies más o menos relacionadas filogenéticamente.

Por estas razones, estas sustancias no se consideran esenciales desde el punto de vista metabólico para los seres que las producen y se les agrupa bajo la denominación común de productos metabolitos secundarios, concepto muy amplio que engloba sustancias de naturaleza y función tan diversa como pigmentos, esencias y sustancias con acción fungicida y bactericida.

Cuadro 2. Tipos de compuestos fenólicos sus átomos y estructura

Átomos de Carbono	Estructura	Tipo
6	C_6	Fenoles simples
		Benzoquinonas
7	$C_6 - C_1$	Ácidos Fenólicos
8	$C_6 - C_2$	Derivados de Tirosina
		Ácidos Fenilacéticos
9	$C_6 - C_3$	Ácidos Cinámicos
		Fenilpropenos
		Cumarinas
10	$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenos
		Antraquinones
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides
		Isoflavonoides
18	$(C_6 - C_3)_2$	Lignanos
		Neolignanos
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Bioflavonoides
n^9	$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas
n^6	$(C_6)_n$	Melaninas Catecolicas
n^{15}	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos condensados

FUENTE: Lock de Ugaz, O. 1994.

2.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son un gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el Dr. Albert Szent-Gyorgi, premio Nobel en Bioquímica, quien les denominó como "vitamina P". El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren en colores amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente (Martínez *et al* 2000).

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da (Pérez, 2003).

Se han publicado estudios epidemiológicos que asocian el consumo de flavonoides con una menor mortalidad general y menor mortalidad por enfermedad coronaria. En la población estudiada, la principal fuente de flavonoides eran cebollas y manzanas, y quercetina el flavonoide más abundante (Hertog, 1995).

Los flavonoides ejercen numerosos efectos bioquímicos, aparentemente beneficiosos, además de su acción como antioxidantes. *In vitro* poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica. Sin embargo, la extrapolación de resultados *in vitro* a lo que ocurre en un organismo *in vivo*, sólo es posible cuando se conoce la biodisponibilidad del compuesto activo.

Las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y β -caroteno), que no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos (Pérez, 2003).

Por sus posibles beneficios de salud, los flavonoides son el grupo más grande de químicos de las plantas, que la comunidad científica han estado estudiando, otros flavonoides tienen efectos antimicrobianos y posiblemente anticarcinogénicos y cardioprotectores (Rodríguez, 2003) (Cuadro 1).

Este tipo de compuestos fenólicos, además de poseer actividad antioxidante, se aplican como colorantes naturales y poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. En los vegetales intervienen en los fenómenos de oxidación-reducción, protegen a otros pigmentos de la luz y la radiación UV, presentan actividad fungicida y contra parásitos agresores, ayudan a la polinización, ya que por sus colores atraen a los insectos junto con los aceites esenciales (Marcano y otros, 1991).

Los flavonoides (C_6 - C_3 - C_6) se pueden clasificar en varias familias según cambios estructurales en su estructura básica, (Figura 3). Poseen varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a su estructura de anillo y se encuentran normalmente como glicósidos. Las posiciones de glicosilación son 7- hidroxilo en flavonas, isoflavonas y dihidroflavonas; 3- y 7- hidroxilo en flavonoles y dihidroflavonoles, y 3- y 5- hidroxilo en antocianidinas. La glucosa es el residuo de glicosilación mas frecuente. Los glicósidos son más hidrosolubles y menos reactivos frente a radicales libres, que su aglicona o flavonoide respectivo (Rice-Evans, 1997).

Su secuencia carbonada: C₆-C₃-C₆ en la que la posición del C₃ determina que sea de diferentes tipos: [flavonas](#), isoflavonas, antocianinas, catequinas, entre otros (Marcano, *et al*, 1991).

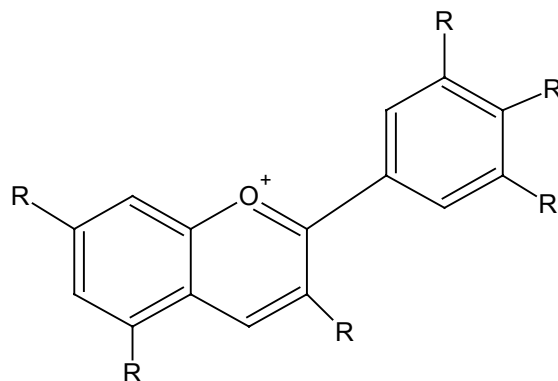


Figura 3. Estructura química general de los flavonoides

Para obtener flavonoides de la dieta se deben comer, sobre todo, muchas frutas y verduras. Otros alimentos que los contienen son el té, el café, el coco, la cerveza, el vino tinto, el mosto de uvas negras y la soya y sus derivados (tofu, miso, leche de soya, entre otros) (Rodríguez, 2003).

La industria cosmética desarrolló derivados de los flavonoides para la piel. Fueron biotecnológicamente modificados para ser activos en la piel. A modo de ejemplo: el flavonoide protege 10 veces más que la vitamina E, porque es un antioxidante mucho más poderoso. Es decir, previene con mayor eficacia la acción de los radicales libres, considerados la causa principal del envejecimiento prematuro de la piel (Rojas, 2000). Además, protege las células epidérmicas al ayudar efectivamente a los mecanismos de defensa de la piel, protege de las alergias solares y la polución ambiental, y previene la formación de arrugas (Rojas, 2000)

2.2 ANTOCIANINAS

Las antocianinas tienen un carácter antioxidante, por lo que su consumo puede suponer un beneficio para la salud. Por cuanto disminuyen los niveles de colesterol (inhibiendo su síntesis), proveen protección contra las enfermedades cardíacas y previenen ciertos tipos de cáncer. Químicamente son miembros del grupo de los polifenoles, también llamados “vitaminas el siglo XXI” por sus efectos beneficiosos.

Los pigmentos vegetales se pueden clasificar en cuatro grandes grupos, dos liposolubles: clorofila y carotenoides, y dos hidrosolubles: las betalaínas y los flavonoides, los cuales, como ya se ha mencionado, se encuentran principalmente en flores y frutos. Las coloraciones de las antocianinas varían con el cambio de pH, de rojo en medio ácido, pasando por amarillo, a violeta y azul en medio alcalino (Lock, 1994)

Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras, se deben a la presencia de antocianinas. Las antocianinas, al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas. Se trata de flavonoides, es decir, sustancias derivadas del núcleo flavano (Díaz de Villegas, 1986)

El pH y la presencia de otras sustancias tienen mucha más influencia sobre el color que la naturaleza de las sustancias del anillo. En la Figura 4 se representa la estructura básica de las antocianinas, en forma de catión flavilio, que es la predominante en valores de bajo pH. Conforme aumenta el pH se pierde un protón, se gana una molécula de agua y se forma una pseudobase carbiol, las cuales son incoloras, por lo que existe una degradación de color conforme aumenta el pH (Díaz Villegas, 1986).

Se conocen cerca de 4.000 pigmentos vegetales en alimentos, incluyendo miles de flavonoides y antocianinas.

Al igual que el resto de los colorantes naturales, las antocianinas presentan una inestabilidad inherente propia dentro de matrices alimentarios; aunque son más estables bajo condiciones de acidez. Pueden ser degradadas por una gran variedad de factores o mecanismos que las convierten en productos incoloros solubles y/o productos con tonalidad café e insoluble. Esta degradación puede ocurrir durante el proceso de extracción y purificación del pigmento o durante el proceso y almacenamiento de los alimentos. Los factores que tienen una mayor influencia en la estabilidad en las antocianinas son el pH, temperatura, la presencia de oxígeno y la exposición a la luz.

El color de estos pigmentos está determinado por el número de grupos hidroxilos. Así como por la naturaleza y número de los grupos alifáticos o aromáticos que están unidos al azúcar y el ambiente fisicoquímico en el cual se encuentra el compuesto (Mazza y Brouillard, 1990). En el Cuadro 3 se muestran las características estructurales de las diferentes antocianinas, dependiendo del tipo de sustitución que presentan.

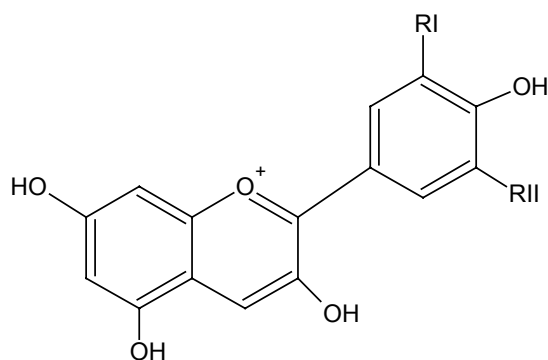


Figura 4. Estructura química de las antocianinas

Se han encontrado seis antocianinas diferentes en la naturaleza, pero los diversos patrones de glicosilación dan lugar a innumerables antocianinas diferentes. Una sola especie vegetal contiene un considerable número de antocianinas diferentes.

Cuadro 3. Tipos de antocianinas y la naturaleza química de los grupos R I y R II.

ANTOCIANINAS	R I	R II
Pelargonidina	- H	- H
Cianidina	- OH	- H
Peonidina	- OCH ₃	- H
delfinidina	- OH	- OH
Petunidina	- OCH ₃	- OH
malvanidina	- OCH ₃	- OCH ₃

FUENTE: ITESM, 2003

2.3 ISOFLAVONAS

Son compuestos químicos que se encuentran de manera natural en las plantas. Están distribuidos en pocas familias, principalmente en las leguminosas y pertenecen a la clase de los fitoestrógenos. Se utilizan como una terapia alternativa de diferentes condiciones dependientes de hormonas, tales como cáncer, síntomas de menopausia (descalcificación ósea y la intolerancia a calores), enfermedades cardiovasculares y osteoporosis (Setchell, 1984).

Otro aspecto terapéutico importante de las isoflavonas, es su efecto antioxidante, donde previene la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) por lo que se limita la formación de aterosclerosis (placas de grasa que se forman en

las paredes de las arterias que dan lugar a trombosis e infartos) (Goldwyn, *et al*, 2000).

Las isoflavonas tienen una estructura química muy parecida a la de los estrógenos que poseen igualmente un anillo fenólico (Figura 5 y 7), debido a esta estructura fenólica, las isoflavonas pueden ser reconocidas por los receptores de los estrógenos y unirse a éstos, por eso se les denomina fitoestrógenos, (Gerber, 2001).

Se trata de unos compuestos que contienen uno o varios grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático. Existen diferentes tipos de isoflavonas dentro del cereal, los más importantes son; la genisteína, la daidzeína y la gliciteína. A partir de éstos se construyen las formas maloniles, acetiles y glucósidos. Por este motivo se cuentan con doce formas distintas (Potter *et al.*, 1998)

En las Figuras 5 y 6 se observan la genisteína es el tipo de isoflavonas más común y el que se encuentra en mayor cantidad en el frijol. Y luego la gliciteína y la daizeína, otras isoflavonas comunes.

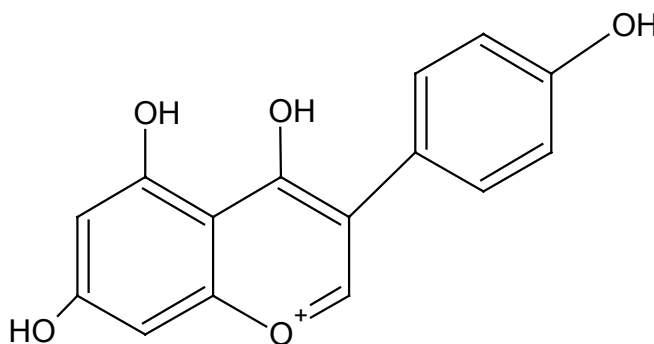


Figura 5. Estructura química de la Genisteína

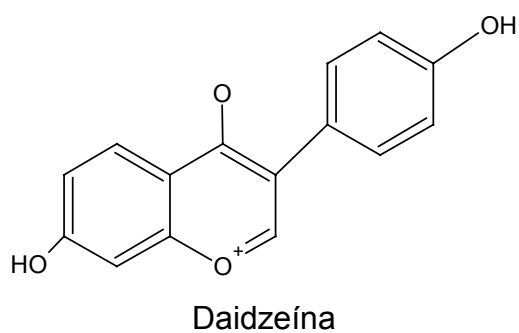
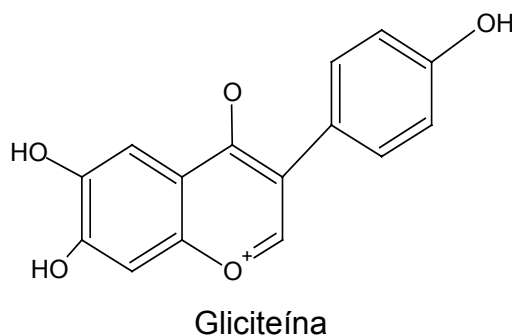


Figura 6. Estructura química de dos tipos de isoflavonas
(Wei, *et al*, 1995)

Las isoflavonas al igual que otros fitoestrógenos como los lignanos y estilbenos, tienen ciertos aspectos en común con el estradiol, tales como un par de grupos hidroxilo separados por una distancia similar y un anillo fenólico (Figura 7) que es prerequisite para la unión al receptor de estrógeno (Cassidy, 2000)

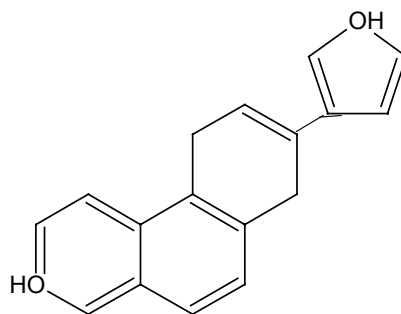


Figura 7. Estructura química del estradiol

3. ANTIOXIDANTES

Un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable, es decir, de un radical libre, sin perder su propia estabilidad electroquímica (Starke y Reed, 2003). Se trata de un grupo de vitaminas, minerales, colorantes naturales y otros compuestos vegetales y enzimas. La mayoría de los antioxidantes se encuentran en alimentos vegetales, por lo que se recomienda incluir frutas, legumbres, verduras y hortalizas o cereales integrales en nuestra dieta sea tan beneficioso.

Millones de radicales libres bombardean diariamente nuestras células. El hecho de que necesiten tantos años para causar daños mayores es por la eficacia de las enzimas que produce nuestro propio organismo para neutralizarlos. Nuestro sistema está luchando contra radicales libres a cada momento del día.

El problema para el organismo se produce cuando tiene que tolerar de forma continua un exceso de radicales libres, el cual es producido mayormente por contaminantes externos que penetran en nuestro cuerpo. La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos. Este exceso no puede ya ser eliminado por el cuerpo (Flores, 2000).

Los radicales libres dañan las membranas de las células, llegando finalmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades. La acción de los radicales libres está ligada al cáncer, así como al daño causado en las arterias por el colesterol "oxidado", lo que relaciona directamente estas moléculas con las enfermedades cardiovasculares.

Existen cada vez más pruebas de la intervención de los radicales libres y de otras moléculas reactivas en los procesos patológicos. La principal evidencia proviene de estudios epidemiológicos que muestran correlaciones estadísticas

entre la incidencia de patología y la presencia de concentraciones bajas de nutrientes antioxidantes en la sangre o alimentos (Murray *et al*, 1997)

Nutrientes antioxidantes como la vitamina C ceden a los radicales libres sus propios electrones salvando así nuestras células de sufrir daño. Los nutrientes antioxidantes por excelencia son el [beta caroteno](#), la [vitamina C](#), la [vitamina E](#), y el [selenio](#) (Starke y Reed, 2003)

La vitamina E es el antioxidante más importante del cuerpo y actúa en la fase lipídica de las membranas en toda la célula.

A la fecha no se tienen estudios sobre la utilización genética de los genes responsables de esta actividad antioxidante, tampoco complementos de ninguno de los antioxidantes mencionados. Sin embargo, se recomienda aumentar el consumo de cereales, nueces, frutas y vegetales, todos ellos son ricos en antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos.

3.1 NUTRIENTES Y SUSTANCIAS NO NUTRITIVAS QUE ACTÚAN COMO ANTIOXIDANTES

3.1.1 VITAMINAS

Las vitaminas son pequeñas moléculas orgánicas presentes en la dieta ya que no pueden ser sintetizadas por el hombre, o bien son sintetizadas en una porción inferior a la necesaria para una buena salud. Las vitaminas suelen dividirse en dos clases: las liposolubles como lo son la vitamina A y la vitamina D; y las hidrosolubles como la vitamina B y la C (Montgomery *et al*, 1998).

Vitamina C: presente en frutas y verduras, frescas y crudas, como guayaba, kiwi, mango, piña, caqui, cítricos, melón, fresas, bayas, pimientos, tomate, brasicáceas (verduras de la familia de la col), frutas y hortalizas en general.

Vitamina E (tocoferol): se encuentra en el germen del trigo, aceite de soja, germen de cereales o cereales de grano entero, aceite de oliva, vegetales de hoja verde y frutos secos.

Betacaroteno o "provitamina A": Pertenece a la familia de los carotenoides de los vegetales. El organismo es capaz de transformarlo en vitamina A. Posee conjuntamente las propiedades de la vitamina A y de los antioxidantes que actúan sobre los radicales libres. Recientemente se ha demostrado su papel en la prevención de las cataratas y su efecto beneficioso en procesos inflamatorios y en los relacionados con el envejecimiento. Algunos alimentos ricos en betacaroteno son las verduras de color verde o coloración rojo-anaranjado-amarillento como la zanahoria, las espinacas, la calabaza y otros; además, ciertas frutas tales como albaricoques, cerezas, melón y melocotón (López, 2001).

3.1.2 MINERALES

Los elementos inorgánicos forman parte esencial de la dieta.

Selenio: Relacionado con un menor riesgo de tumores de piel, hígado, colon y mama. Asimismo vinculado al funcionamiento de la glutatión peroxidasa (enzima antioxidante de nuestro organismo). En carnes, pescados, marisco, cereales, huevos, frutas y verduras.

Zinc: Favorece la formación de nuevas proteínas (renovación celular), participa en la lucha contra los radicales libres y en la síntesis de enzimas, interviene en el sistema inmune o de defensas y favorece el buen estado de piel y mucosas (tonicidad y elasticidad de la piel). Constituyen buena fuente de zinc las carnes y vísceras, los pescados, los huevos, los cereales completos y las legumbres.

Cobre: Potencia el sistema inmune, participa en la formación de enzimas, proteínas y neuro-transmisores cerebrales (renovación celular y estimulante del sistema nervioso) y es un agente antiinflamatorio y antiinfeccioso. Y facilita la síntesis de colágeno y elastina (necesarios para el buen estado de los vasos sanguíneos, del cartílago, de los pulmones y de la piel), actúa como antioxidante

protegiendo las células de los efectos tóxicos de los radicales libres y facilita la fijación del calcio y del fósforo. Alimentos ricos en cobre: hígado, pescado, marisco, cereales completos y vegetales verdes (López, 2001).

3.1.3 AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos procedentes de las proteínas de la dieta son utilizadas para la biosíntesis de las proteínas titulares. Los aminoácidos actúan también como fuente de nitrógeno para la biosíntesis de otros compuestos (Montgomery *et al*, 1998).

Cisteína: aminoácido no esencial, nuestro cuerpo puede fabricarlo sin problemas. Es importante para la producción de enzimas contra los radicales libres, como la glutatión peroxidasa. El hígado y nuestras defensas lo utilizan para desintoxicar el cuerpo de sustancias químicas y otros elementos nocivos. La cisteína, que se encuentra en carnes, pescados, huevos y lácteos, es un detoxificante potente contra los agentes que deprimen el sistema inmune, como el alcohol, el tabaco y la polución ambiental (López, 2001).

3.1.4 COLORANTES NATURALES U OTROS COMPUESTOS DE VEGETALES

Se encuentran dentro de este grupo de antioxidantes a los **Flavonoides:** Comprenden a los flavonoles, los antocianidoles y a las flavonas, colorantes naturales con acción antioxidante que constituyen el grupo más importante de la familia de los polifenoles, muy presentes en el mundo vegetal. Protegen el sistema cardiovascular y activan las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa, antioxidantes presentes de forma natural en nuestro organismo. Están en la familia de las coles, las verduras de hoja verde, las frutas rojas y moradas y los cítricos. Según la “American Cancer Society”, reducen el riesgo de cáncer colorrectal. También antes mencionadas las **Isoflavonas** (López, 2001).

Ácido alfa-lipoico: Es un carotenoide de algunas verduras y frutas, que ayuda a neutralizar los efectos de los radicales libres potenciando las funciones antioxidantes de las vitaminas C, E y de la enzima glutatión peroxidasa. Abunda en el tomate.

3.1.5 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Además de las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, hay otras sustancias antioxidantes como la coenzima Q-10.

Coenzima Q-10: Ayuda a las enzimas a realizar su función. Se ha comprobado una gran similitud entre las propiedades antioxidantes de la vitamina E y las de la coenzima Q-10, que juega un importante papel en la generación de energía celular, y a su vez es un estimulante inmune, mejora la circulación y ayuda a proteger el sistema cardiovascular (López, 2001).

4. EL FRIJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris*)

Phaseolus vulgaris, es una planta con una altura promedio de 50 a 70 cm; con raíces bien desarrolladas, presenta una raíz principal pivotante y muchas raíces secundarias cercanas a la superficie; tallos delgados y débiles, cuadrangulares, hojas trifoliadas. Produce de 2 a 5 semillas reniformes oblongas a ovals o redondeadas, poco comprimidas, de color rojo, amarillo, café o negro (Figura 8).

Se utilizan para la alimentación humana se consumen los granos secos o tiernos; las vainas enteras y verdes se consumen como verdura. Pueden utilizarse como abono verde en rotación, intercalado como cobertura con otros cultivos y como forraje de corte para animales (Centro Internacional de Información sobre Cultivos de Cobertura, 2002).

El frijol es considerado parte de la alimentación básica en muchos países de Latinoamérica. Las leguminosas son una importante fuente de proteína explica el bioquímico Javier Butrón. Ventajas por su alto contenido en glúcidos, (su importancia energética), y de otros componentes como lípidos, fibra, vitaminas y minerales. Su contenido de fibra soluble lo hace especialmente interesante en relación con el control de la colesterolemia (Castellanos *et al*, 1997) (Cardador *et al*, 2002).

Estas actividades han sido comprobadas por diversos estudios epidemiológicos quienes han demostrado que los componentes de los frijoles están asociados con la disminución del riesgo de las enfermedades crónicas (Kafui and Rui, sf)

Gran parte del reciente interés, es debido a la presencia de isoflavonas en el frijol, y en particular de la genisteína, una de las dos isoflavonas primarias del frijol soya. La genisteína atrajo mucho la atención de la comunidad de investigación, no sólo debido a su potencial efecto estrogénico, sino también porque inhibe varias enzimas claves supuestamente involucradas en la carcinogénesis. (Reyes, 1993).

También existen varios componentes no-isoflavónicos en el frijol, como las saponinas. El frijol es una de las fuentes dietarios más importantes de este tipo de compuestos no-isoflavónicos (Reyes, 1993) (Cuadro 4).

Otros componentes importantes en el frijol y que están en estudios por su capacidad antioxidante, son las antocianinas, conocidos como colorantes naturales. Químicamente son miembros del grupo de los polifenoles, también llamados “vitaminas el siglo XXI” por sus efectos beneficiosos. Dentro de frijol, según Takeoka, (1997), las antocianinas mas comunes y que se encuentran en mayor cantidad son malvidina 3-5 di-glucósido y la delfinidina 3-glucósido (Cuadro 4).



Figura 8. Frijol negro, *Phaseolus vulgaris* , de la variedad Perla

5. MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.)

Zea mays es una gramínea anual, de crecimiento rápido, hasta de 2,5 m de altura, con hojas largas y anchas en forma de tira (Quesada, sf.).

El maíz constituye una buena fuente de carbohidratos, proteínas de origen vegetal y fibra dietética (almidones resistentes). Estos componentes tienen efectos fisiológicos positivos, relacionados con la menor prevalencia de enfermedades intestinales (Guisell, 2000). Actualmente se ha comprobado que las propiedades de los compuestos químicos que los caracterizan están asociadas con la variedad. Estos efectos resultan útiles tanto en la prevención como en el tratamiento de la Diabetes Mellitus, trastornos cardiovasculares, constipación, diverticulitis y cáncer de colon (Gisell, 2000).

El grano de algunas leguminosas junto con el maíz, son la base de la alimentación de México y en otros países, principalmente por sus raíces culturales e históricas. El maíz se consume en una gran variedad de formas,

además de ser demandado por varias clases comerciales de diferente color, forma y tamaño (Castellanos *et al*, 1997) (Figura 9).

En el mundo hay varios tipos de maíz y de ellos hay varios colores desde el blanco, amarillo, rojos, morados, café, verdes, azules y morados. El maíz azul generalmente es cultivado en América Latina, principalmente en Perú y los peruanos tienen una bebida típica hecha con el maíz morado o azul (Castellanos *et al*, 1997). Los mexicanos llaman "maíz azul" a una especie que se da al Norte del país y en Estados Unidos por la parte de Nuevo México. Tiene granos salteados de colores, algunos de ellos azules. Se dice así en contraste con el maíz amarillo, el normal (Castellanos *et al*, 1997).

El color azul, morado, y rojo presentes en el maíz debido a la presencia de antocianinas. El maíz con antocianinas es utilizado como colorante para los jarabes, galletas y otros alimentos en Japón (Aoki y otros, sf). Y según Fossen Torgils (2001), las antocianinas más comunes presentes en el maíz son Cianidina 3 glucósido y Delfinidina (Cuadro 4).



Figura 9. Maíz azul

6. JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Hibiscus sabdariffa L. es una planta típica de los trópicos principalmente se puede encontrar en regiones con manglares (Melecchi y otros, 2002). De la familia de las Malvaceae, el *Hibisco* aporta entre 250 y 300 especies (Figura 10)

Su flor es utilizada como planta medicinal en Asia, África y otros lugares. También es comúnmente usada para jaleas, mermeladas y remedios. Su brillante color rojo y su sabor único, es característico en algunos productos alimenticios. Se convirtieron en remedios naturales para bajar de peso, calmar la tos o prevenir la caída del cabello. Pero recientemente, se ha detectado que estas contienen excelentes reservas de flavonoides y antocianósidos (Rojas, 1999 y Rojas, 2000).

El *Hibiscus* ayuda a reducir las grasas y el colesterol, porque estimula la función hepatorrenal. Así, hoy, todos los especialistas en el mundo recomiendan sumar la infusión de *Hibisco* a la dieta para defender al organismo de los daños de los radicales libres y también al corazón de la hipertensión. Pero no todos los compuestos fenólicos presentes en este género son iguales. Hasta ahora, el más reconocido es el *Hibiscus sabdariffa*, especie muy usada en forma de fitomedicamentos y en el que se ha definido la acción antioxidante e hipotensora (Rojas, 1999 y Rojas, 2000).

Una de las ventajas de esta especie es la alta reproductividad, además de que su extracción es un proceso simple y de bajo costo (Melecchi *et al*, 2002)

El color rojo de su flor está dado por pigmentos conocidos como antocianinas, que son las responsables de la coloración de varios alimentos (Tsai & Ou, 1996) (Tsaia *et al*, 2002).

En la jamaica las antocianinas que se encuentran en mayor cantidad según Chau-Jong Wang, 2000, son la Cianidina 3 glucósido y la Delfinidina 3 glucósido, pero otros investigadores han descubierto la presencia de Cianidina 3-o-soforosido como lo hizo Hideo Yamasaki, 1996 (Cuadro 4)



Figura 10. Flor de jamaica

Cuadro 4. Compuestos fenólicos más comunes presentes en las muestras a analizar

Fuente Natural	Compuestos fenólicos	Referencias
Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Cianidina 3 glucósido Delfinidina 3 glucósido Cianidina 3-o-soforosido	Chau-Jong Wang, 2000 Hideo Yamasaki, 1996.
Frijol Negro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	malvidina 3-5 di glucósido delfinidina 3-glucósido	Takeoka, 1997
Maíz Azul (<i>Zea Mays</i>)	Cianidina 3 glucósido Delfinidina	Torgils, 2001

FUENTE: ITESM, 2003

7. CROMATOGRAFÍA DE MICROEXTRACCIÓN CON COLUMNA DE FASE REVERSA

La cromatografía es una técnica que permite la separación de un líquido y disolvente de las moléculas basado en su peso molecular, la polaridad (hidrofóbica contra hidrofílico). Y la carga o la elasticidad (Alamo, *et al*, 2000).

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. Hay una fase estacionaria en la matriz la cual es apolar. Las fases móviles son las polares, así las sustancias más polares eluyen primero.

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede sustituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.

En la separación de compuestos fenólicos mediante fase reversa la resina más comúnmente empleada posee una cadena lineal de 18 carbonos y se denomina como C18 (Anexo 2).

Los cartuchos Sep Pak ®, son diseñados y hechos especialmente para la extracción o fraccionamiento de la muestra. Debe ser reproductivo en actividad y capacidad, con distribuciones de tamaño óptimas del poro y de partícula del área superficial (Alamo, *et al*, 2002)

La superficie de la columna debe de cumplir tres actividades ante el solvente disponible. Primero, cada porción se prueba bajo especificaciones rígidas para la actividad, segundo, la retención y tercera, la selectividad cromatográficas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se desarrolla en el Centro de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey.

Para la extracción de compuestos fenólicos del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), se utilizaron las testas de los granos donados por el Centro INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). El extracto fenólico del maíz (*Zea mays L.*) se obtuvo del maíz molido, proveniente de líneas experimentales de la Escuela de Zootecnia del ITESM (Monterrey, México). Los compuestos extraídos de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) se extrajeron de la flor de la planta, de la localidad (Monterrey, N.L., México). Los reactivos y solventes utilizados en los protocolos se obtuvieron de Fermont-Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. (Monterrey, N.L., México), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO., EUA.), Fisher Scientific Int (Winnipeg, MB., Canadá) y Merck Co. (Darmstadt, Alemania). Los cartuchos cromatográficos de fase reversa (Sep Paks) C-18, 5g absorbente, se obtuvieron de Waters Co. (Milford, MA., EUA).

Los solventes orgánicos utilizados (metanol, acetona, agua y etanol), fueron preparados en el laboratorio antes de usar. Los reactivos y solventes se obtuvieron de Fermont-Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. (Monterrey, N.L., México), Desarrollo de especialidades químicas, S.A. de C.V. (Nogalar, San Nicolas de los Garza, N.L. México).

Para cada muestra se trabajó con tres tratamientos y cada una con tres repeticiones, por triplicado denominados R₁, R₂ y R₃

1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE DOCE VARIEDADES DE FRIJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris L.*)

Se seleccionaron 12 variedades mexicanas de frijol negro, las cuales, fueron donadas en enero del 2002, por el Dr. Jorge Acosta Gallegos, CIR, CENTRO INIFAP, Campo Experimental Valle de México, Chapingo, México (Cuadro 5).

Para la caracterización física de cada variedad fueron identificadas con un número específico. Se contabilizaron 100 frijoles de cada variedad. Se pesaron, se les midió el color, con un Colorímetro Minolta CR-300 (*Minolta Co., Ltd., Osaka, Japón*), se les calculó el valor de "E" (grado de color para cada especie). Se dejaron remojando 12 horas en 30 ml de agua destilada. Después del tiempo de remojo se les quitó la testa, se separó de los cotiledones y se pesaron por aparte (los cotiledones de las testas). Esto se hizo para cada variedad, si se dificultaba la extracción de la testa se le agregaba más agua a esa variedad. Se dejaron en la estufa por 12 horas (35°C) para luego determinarles por separado, el porcentaje de humedad a las testas y a los cotiledones.

El objetivo de esta fase era determinar si existían diferencias entre las concentraciones de isoflavonas entre las variedades recibidas por INIFAP y seleccionar aquella que tuviera mayor contenido de isoflavonas para su uso en el estudio de fraccionamiento.

Se considero necesario conocer el contenido de fenólicos totales de cada variedad, ya que además de isoflavonas es posible que existan otros compuestos que pueden ejercer alguna actividad biológica importante. Por lo tanto se llevo a cabo la prueba Folin a los extractos crudos (80% metanol) de las 12 variedades de frijol.

Cuadro 5. Variedades de frijol negro analizadas

Número de la variedad	Variedades de <i>Phaseolus vulgaris L.</i>
1	Mx 332
2	NG Cotaxtla
3	NG 8025
4	NG Sn. Luis
5	NG Altiplano
6	NG 150
7	NG Sahuatoba
8	NG Tacana
9	NG Vizcaya
10	NG Otomí
11	NG Perla
12	NG Inifap

FUENTE: ITESM, 2003

2. EVALUACIÓN DE DIFERENTES SOLVENTES PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se pesaron testas de frijol negro (5 g) y se les realizó la separación con un homogenizador Ultra-Turrax T25 Basic IKA-Werke (San Nicolás, N.L, México) a 16000 rpm por 5 minutos con cada uno de los solventes de prueba (metanol 80%, acetona 70%, etanol 96% y agua 100%).

Se centrifugó para separar los compuestos, se tomó una muestra del sobrenadante para realizarle cuantificación de fenólicos totales. Al precipitado se

le realizó otro lavado con cada solvente orgánico. Se dejó reposar todo un día a 4 grados Celsius.

Al final, todos los lavados se juntaron y se evaporaron en el rotavapor (Buchi, Suiza). Se realizó la cuantificación de fenólicos totales, se agregó 500µl de reactivo Folin y 50 µl de la muestra analizar, antes y después de evaporar.

Preparación de muestras para el análisis en HPLC, Cromatografía Líquida De Alto Rendimiento. Se utiliza en general una fase de reversa ODS C-18 (OctaDodecilsilano). La idea de esta fase es determinar los tipos y la cantidad de isoflavonas y flavonoides presentes en las muestras de extracción con cada solvente.

Se tomó 10ml de muestra concentrada o 50ml de muestra diluida (10ml de muestra y 40 de agua); y se les ajustó el pH a 3.5. Se pasó la muestra por la columna. Posteriormente se lavó con agua pH 3.5. Se eluyó con 2ml de Metanol 30% (F₁), y se volvió a agregar 2ml de metanol 100% (F₂) (Cisneros, M., 2003).

3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR FRACCIONAMIENTO

La bioseparación de los compuestos fenólicos de los diferentes alimentos se realizó con modificaciones al protocolo descrito por Oszmianski et al, 1998.

3.1 EXTRACCIÓN CON SOLUCIÓN DE ACETONA:AGUA (70 : 30)

El propósito de esta extracción, fue la separación de los componentes que posee el frijol, la jamaica y el maíz azul, como los azúcares, proteína, lípidos, carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros.

Las testas de frijol (10g) se colocaron en 150ml de solución acetona: agua 70:30, en el caso de la jamaica y el maíz se utilizó una solución de acetona:agua de 80:20. Se homogenizaron (10min). Se le agregó 50ml adicionales de solución, para desprender las cáscaras de los bordes. Fue centrifugado por 10 minutos a 3500rpm y se obtuvieron dos capas donde se separó la parte sólida de la líquida. En total se realizaron cuatro lavados con la solución acetona: agua, cada 12 horas.

Al terminar con los lavados, la muestra se filtró al vacío, para separar los pequeños residuos sólidos. En el rotavapor-R, (Buchi, Suiza), el cual se encuentra unido a un extremo con un baño agua fría (modelo 1140 VWR, Scientific Company) y al otro con un baño de agua caliente (Boekel Grant) y todo conectado a una bomba de vacío, (modelo GP110, Savanr, Gel Pump). (Anexo 13) Este elimina la acetona por evaporación y a la vez se concentra la muestra.

3.2 EXTRACCIÓN CON ÉTER ETILICO

El objetivo de esta fase fue la extracción de los lípidos, carbohidratos, carotenos y las proteínas que quedaron en la extracción anterior. En esta etapa se debió trabajar dentro del extractor de aire, dadas las características del reactivo.

Se realizaron en total dos extracciones con éter. La primera, se realizó a partir de la fase acuosa (50ml) con éter etílico (50ml) (1: 1). Se agitó (10min) y se centrifugaron para separar la fase acuosa de la etérea. Se extrajo la fase etérea (sobrenadante). La segunda extracción consistió del precipitado de la extracción anterior más 50ml de éter.

3.3 FRACCIONAMIENTO A pH 3.5

Conforme se fue realizando el fraccionamiento a cada fracción obtenida se les iba denominando con una letra del abecedario. A la muestra sin éter se le llamó

fracción **A**, la cual se aforó a 50ml, de éstos, se tomaron 20ml para el fraccionamiento del frijol, para la jamaica 15ml fueron suficientes, y para el fraccionamiento del maíz, fueron necesarios 50 ml de extracto. Se les ajustó el pH a 3.5 con HCl o NaOH, según se requieran.

Para el preacondicionamiento del Sep Pak, se utilizó metanol (20ml) y agua (20ml). Se cargó la columna con la muestra. El líquido que pasó se le denominó **B**. Posteriormente fue lavado el Sep Pak con agua bidestilada (20ml) es la solución **C**, y luego con HCl 0,01M (20ml), es **D**. Los compuestos de interés quedaron atrapados en el SepPak. Se le agregó acetato de etilo (30ml) solución **E**, seguido de metanol (30ml) es **F** (Anexo 5).

Para la segunda parte del fraccionamiento se necesitó un nuevo Sep Pak, esta fase es de reconfirmación de la efectividad del fraccionamiento, donde los compuestos fenólicos ya están en las fracciones anteriores. Se ajustó el pH a 2.5, tanto de la fracción **B** como a **G**, (**C+ D**).

Se pasó la solución **B**, el líquido que pasa se le llamó **H**. Se lava con metanol (30ml), el líquido es **I**. Se volvió a preacondicionar el Sep Pak, con metanol (20ml), posteriormente con 20ml de HCl 0.01M. Se alimentó el Sep Pak con **G**, el líquido que pasa es **J**. Y se lavó el Sep Pak con metanol (30ml), el líquido es **K** (Anexo 4).

3.4 EVAPORACIÓN Y CONCENTRACIÓN EN METANOL

Se evaporaron en el rotavapor las fracciones **E**, **F**, **I** y **K** a sequedad y se resuspendieron en 20ml de metanol 100%, las muestras de frijol y en 15ml de metanol la jamaica y el maíz.

A estas fracciones resuspendidas en metanol se les hizo las pruebas de cuantificación de compuestos fenólicos para comprobar la efectividad del fraccionamiento.

4. DETERMINACION DE FENOLICOS TOTALES

La concentración de fenólicos totales solubles presentes en las diferentes fracciones, se determinó con base en el método de Folin-Ciocalteu descrito por Aberson y Simon, 2001.

El método consiste en adicionar a la muestra (50 μ l) 500 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, posteriormente se dejó reaccionar. Una vez terminada la reacción, las muestras se dejaron reposar (20 min) a temperatura ambiente y se realizaron las lecturas espectrofotométricas a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU® 650 (Fullerton, CA., EUA.) (Anexo 13).

Al obtener la absorbancia se calculó la concentración (ppm) de los compuestos fenólicos totales presentes en cada una de las fracciones. La concentración de fenólicos totales (mg/l) se expresó en equivalentes de ácido gálico (Anexo 8).

Se compararon los resultados entre tratamientos denominados R1, R2 y R3.

5. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMERICAS TOTALES

El método pH diferencial descrito por Wrolstad (2000) se basa en la reacción de la muestra (100 μ l) en buffer de cloruro de potasio pH 1,0 y en buffer de acetato de sodio pH 4,5; con un tiempo de equilibrio de reacción de 15 min. a temperatura ambiente (Anexo 10). Posteriormente se hicieron una serie de

barridos espectrales en un espectrofotómetro con el fin de obtener la absorbancia máxima en el rango visible (400-800 nm). La λ_{\max} promedio utilizada para la cuantificación fue de 515 a 520 nm. Así mismo se midió la absorbancia a 700 nm para la corrección por turbidez de ambas muestras. El contenido de antocianinas se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar y el peso molecular de la antocianina presente en la muestra con mayor proporción (Anexo 9).

Las longitudes de onda a las cuales están presentes las antocianinas, varían para las diferentes muestras ya que cada alimento contiene tipos diferentes de antocianinas. Aunque todas las antocianinas se encuentran dentro de un mismo rango entre 515 a 520nm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES DE FRIJOL NEGRO A ANALIZAR

Se seleccionó frijol por ser la leguminosa de mayor consumo en México y por ser una fuente con potencial nutracéutico, ricos en proteínas, carbohidratos, hierro y otros nutrientes. Se utilizaron las testas del frijol negro pues en la literatura se reporta que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se encuentra en las cáscaras, donde ellos mismos le brindan color al grano (Gómez, *et al*, 2000).

Las doce variedades de frijol negro, presentaron cantidades superiores de compuestos en las testas, a lo encontrado en los cotiledones molidos, donde el total de fenólicos fue $3.2 \pm 0,15$ μ moles/g en equivalentes a catequina.

Comparando el contenido de fenólicos totales de las 12 variedades de frijol negro analizadas por el método de Folin ácido, la variedad Mx 332 fue la que obtuvo mayor concentración. Aunque la variedad Sahuatoba y Otomi, también presentaron valores elevados en cuanto al contenido de fenólicos totales, pero la variedad Mx 332 fue la que presentó la mayor cantidad de antocianinas por eso fue la seleccionada para posteriores análisis (Figura 11). En la prueba de pH diferencial, la variedad Perla obtuvo muy bajas concentraciones de antocianinas, pero en la cuantificación de isoflavonas en las variedades analizadas, el frijol Perla fue el que presentó mayor contenido, por lo cual también fue seleccionada.

A partir de esta fase se denominó al frijol negro Mx 332 como frijol 1 y a la variedad Perla como frijol 2.

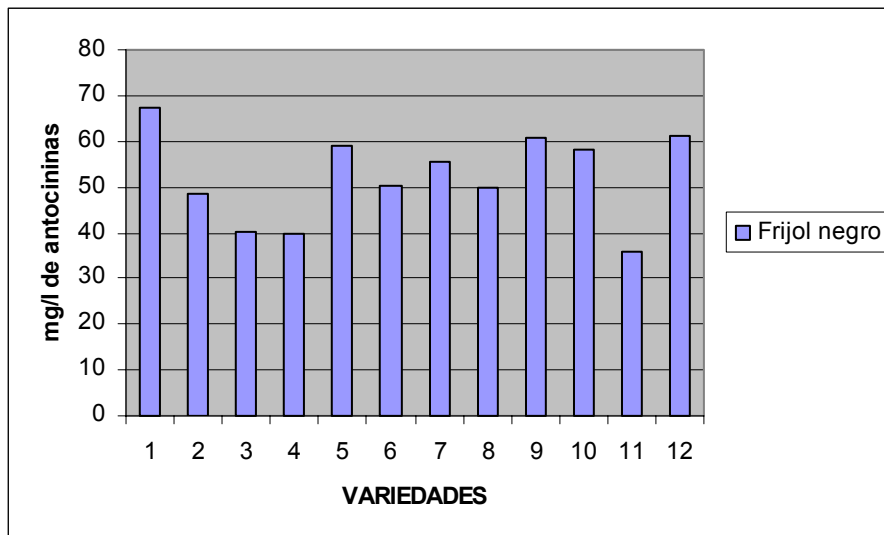


Figura 11. Contenido de antocianinas en cada una de las doce variedades de frijol negro analizadas (1-Mx332, 2-Cotaxtla,3-8025,4-San Luis, 5-Altiplano,6-150,7-Sahuatoba, 8-Tacana, 9-Viscaya, 10-Otomi, 11-Perla y 12-Inifap)

FUENTE: CB, ITESM, 2003

2. EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS CON DIFERENTES SOLVENTES

La idea principal de esta etapa fue probar cual era el mejor solvente para la extracción de los compuestos fenólicos de interés (antocianinas, isoflavonas y flavonoides), tomando en cuenta que los solventes polares extraen compuestos polares y los solventes no polares extraen compuestos no polares, con sus pocas excepciones (Mata, 2003).

En el anexo 4 se puede observar como desde los primeros lavados se obtuvo una buena efectividad con cada uno de los solventes.

Después de los análisis de la técnica de Folin, se comprobó que el solvente que mejor extrajo compuestos fenólicos fue la acetona (Figura 12.)

La acetona fue el solvente no polar que permitió la separación de varios compuestos no polares como lo son las proteínas, lípidos, fibras, carbohidratos, entre otros. Separando así, los compuestos polares de los no polares.

Por el contrario el etanol (96%) fue solvente más deficiente en la extracción, según los resultados de la cuantificación de fenólicos totales se puede suponer que es debido a que el etanol es un líquido muy polar que impidió la extracción de varios compuestos no polares. De la misma manera se comporta el metanol y el agua al ser compuestos polares.

Durante los primeros lavados se consideraba al agua como el mejor solvente para la extracción de compuestos fenólicos, pero al final de la extracción, no fue el más efectivo (Anexo 3).

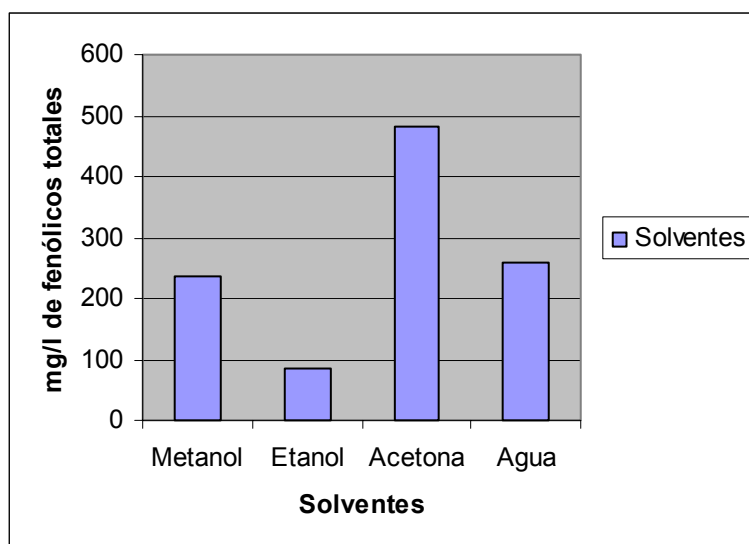


Figura 12. Contenido de fenólicos totales, de las muestras extraídas a partir de los diferentes solventes (metanol 80%, etanol 96%, acetona 70% y agua)

FUENTE: CB, ITESM, 2003

A partir de estos resultados, se utilizó la acetona en el método de fraccionamiento para la extracción de los compuestos fenólicos de los alimentos a analizar en este proyecto.

3. FRACCIONAMIENTO

3.1 Cuantificación de fenólicos totales

En esta etapa fue muy importante considerar las propiedades ácidas (pH 3,5) de la muestra y la polaridad de los compuestos y solventes utilizados en el método de bioseparación de los compuestos fenólicos.

El extracto crudo, es el resultado de la extracción con acetona. En esta fracción se encuentran todos los compuestos de los alimentos analizados, la acetona como solvente utilizado para la extracción, permite la separación de los compuestos polares y no polares.

Al realizar la cuantificación de compuestos fenólicos totales, a esta fracción, los resultados fueron muy elevados, pues se encuentran todos los compuestos fenólicos mezclados, pero conforme se va realizando el fraccionamiento, en las siguientes fracciones hay separación de ellos, las concentraciones de fenólicos van disminuyendo (Figura 13). En los resultados se observó como en las últimas fracciones (I y la K), la cantidad de compuestos fenólicos es insignificante.

El resultado del fraccionamiento con éter etílico fue la extracción de los lípidos, proteínas, carbohidratos y carotenoides, que son insolubles al éter, y los cuales fueron separados en la extracción anterior. Es la fracción A donde los compuestos fenólicos aún están todos juntos. Sus concentraciones deben ser muy parecidas a las concentraciones del extracto crudo. Pero en algunos casos se obtuvieron grandes diferencias entre ellos, causadas por pérdidas en la

segunda extracción; se cree que a la hora de extraer los lípidos, carbohidratos, proteínas y otros; se perdieron algunos compuestos de interés (antocianinas, isoflavonas y flavonoides) con ellos (Figura 13).

Las primeras fracciones del fraccionamiento (B, C y D), son considerados “lavados” después del paso de la muestra por la columna. En ellas no debe haber compuestos fenólicos y si así fuera el fraccionamiento no sería lo adecuado desde el inicio.

En la fracción con acetato de etilo, E, se separaron y extrajeron los flavonoides e isoflavonas del resto de los compuestos fenólicos. Es en esta fracción en la que se inicia la separación de los fenólicos totales. Al estar la muestra con los compuestos fenólicos totales a un pH de 3,5 (ácida), los hace solubles a bases como el acetato de etilo y al éter, en la extracción anterior (Marcano y Hosegawa, 1991). En A, la concentración de fenólicos totales disminuye con respecto a las fracciones anteriores, pues en esta fracción, ya están separados dos tipos de compuestos y ya no están presentes todos en la misma fracción (Figura 13).

Debido a su polaridad los compuestos fenólicos permiten su separación por solubilidad a solventes polares, como sucede con el metanol en la fracción F. El metanol permite la extracción específicamente de las antocianinas, pigmentos responsables del color azul del maíz, el rojo de las flores de jamaica y el negro de las testas del frijol. El metanol permite la diferenciación de otros pigmentos liposolubles igualmente coloreados como los carotenos. En esta fracción (F) en que la concentración de fenólicos totales es más alta que el contenido de fenólicos, presentes en la fracción E, lo que quiere decir que en los alimentos analizados hay más antocianinas que flavonoides e isoflavonas.

En las fracciones acuosas H y J nunca se encontraron compuestos fenólicos ya que estas fracciones son “lavados de reconfirmación”, donde se espera que los

compuestos fenólicos ya se encuentren en las fracciones anteriores y no en éstas; por lo que no se les hizo la cuantificación de antocianinas (Anexo 7).

Por su parte en las fracciones I y K, diluidas en metanol, se pretendía rescatar las antocianinas u otros compuestos como los ácidos fenólicos (pH 2,5); que quedaron eliminados en las fracciones anteriores. En estas dos últimas fracciones, las concentraciones de fenólicos totales fueron muy bajas, demostrando la efectividad de la técnica (Figura 13).

La jamaica fue la muestra de las analizadas, que tiene mayor concentración de fenólicos totales (Figura 13), por su gran cantidad de antocianinas (Figura 16). El maíz azul, fue la muestra con concentraciones más bajas de fenólicos totales. Las dos variedades de frijol negro, se mantuvieron semejantes en todas las fracciones, pero más adelante se verán las diferencias en cuanto el tipo de fenólicos, presentes en cada variedad.

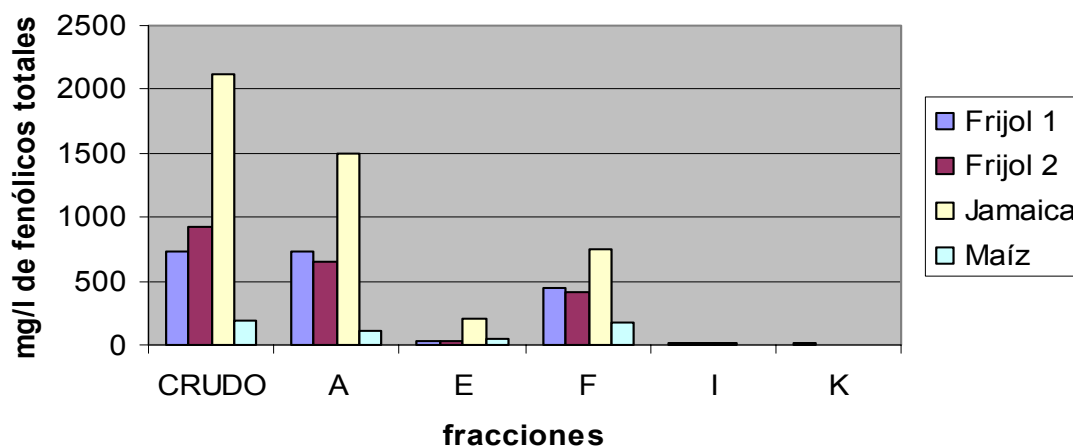


Figura 13. Concentraciones de compuestos fenólicos, equivalentes ácido gálico, de las fracciones.

CRUDO- extracción con acetona, fracción A-extracción con éter, fracción E- extracción con acetato de etilo, Fracción F-extracción con metanol, fracción I y fracción K, lavados con metanol.

FUENTE: CB, ITESM, 2003

Los tipos y las concentraciones de los polifenoles presentes en un mismo alimento dependen principalmente de la variedad, de las condiciones climáticas, de la maduración del alimento y de las técnicas empleadas para su extracción (Alamo, *et al*, 2000). Éstas son algunas de las causas que explican la diferencia en cuanto al contenido de fenólicos entre las dos variedades de frijol negro seleccionadas para ser analizadas.

En las Figuras 14 y 15 se pueden observar, las diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos y antocianinas en las dos variedades de frijol negro.

El frijol 1 (Mx 332) contiene mayor cantidad de antocianinas, en comparación con el frijol 2 (Perla). Es grande la diferencia en cuanto al contenido de antocianinas entre ambas variedades (Figura 15), pero no existe mucha diferencia en el contenido de fenólicos totales, lo cual demuestra que el frijol 2 contiene gran cantidad de flavonoides e isoflavonas (Figura 14).

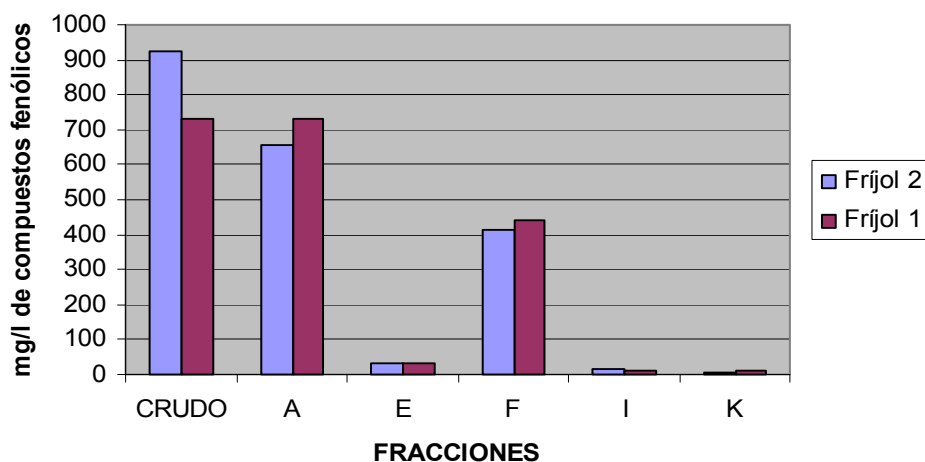


Figura 14. Comparación entre las concentraciones de fenólicos totales en las dos variedades de frijol negro; mg/l expresados en ácido Gálico.

(CRUDO- extracción con acetona, fracción A-extracción con éter, fracción E- extracción con acetato de etilo, Fracción F-extracción con metanol, fracción I y fracción K, lavados con metanol.

FUENTE: CB, ITESM, 2003

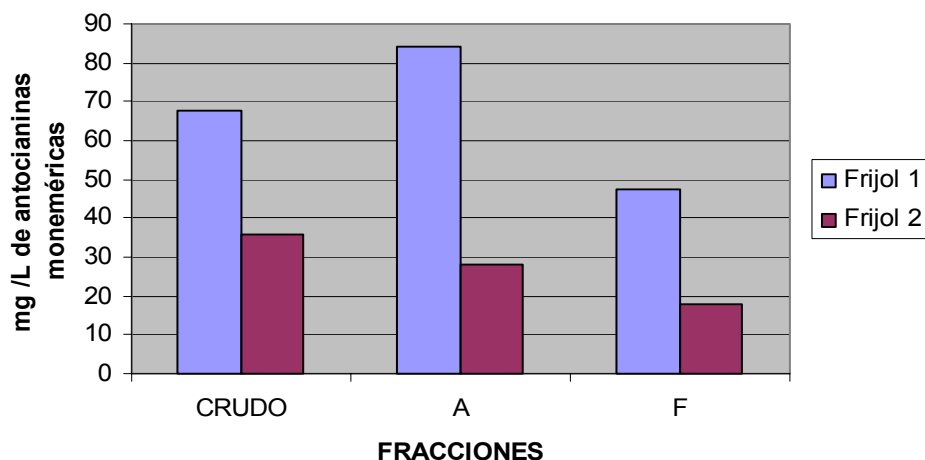


Figura 15. Comparación entre las concentraciones de antocianinas monoméricas de las dos variedades de frijol negro.

(CRUDO- extracción con acetona, fracción A-extracción con éter, fracción E-extracción con acetato de etilo, Fracción F-extracción con metanol, fracción I y fracción K, lavados con metanol.

FUENTE: CB, ITESM, 2003

3.2 Cuantificación de antocianinas totales

En la cuantificación de antocianinas por la técnica de pH diferencial, se analizaron solo las fracciones crudo, A (extracción con éter) y F (extracción con metanol); ya que fueron las fracciones en las que se asegura el contenido de las antocianinas. Crudo y A, porque en ellas se encuentran todos los compuestos fenólicos juntos, y en F, pues es la fracción en que se espera extraerlas. Mientras que en la fracción E (extracción con acetato de etilo) no se presentaron este tipo de fenólicos en su lugar están las isoflavonas y flavonoides.

Los resultados de esta técnica no fueron los esperados, se esperaba que al igual que en las concentraciones de fenólicos totales, las fracciones cruda y A, debieron de ser las que contienen mayores concentraciones de antocianinas, y con valores parecidos entre ellos, pero en este caso no fue así.

Se puede observar en la jamaica un bajo contenido de antocianinas en la primera fracción y la siguiente fracción aumenta (Figura 16) cuando se esperaría lo contrario en la primera mayor concentración que en las siguientes. En las tres fracciones debió de haber la misma cantidad de antocianinas, hubo pérdidas conforme se fue realizando el fraccionamiento, pero no antes.

Otra causa de esta diferencia en las concentraciones podría ser que no todas las fracciones se encontraban en la misma base másica, es decir, no todas las fracciones tienen el mismo contenido másico inicial, de testas, de maíz o de jamaica. Lo que explicaría la diferencia entre el contenido de antocianinas en las tres muestras (Anexo 12).

La concentración de antocianinas totales obtenida para este tipo de fenólico debe encontrarse preferiblemente dentro del rango de absorbancia 0.4-0.8.

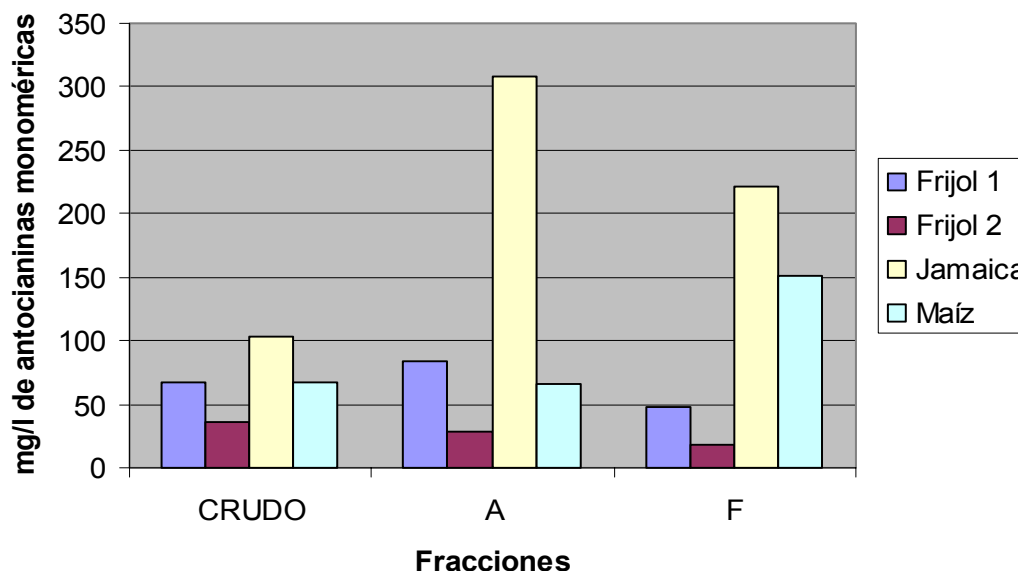


Figura 16. Comparación entre las concentraciones de antocianinas totales, presentes en las tres fracciones analizadas

(CRUDO- extracción con acetona, fracción A- extracción con éter y F-extracción con metanol)

FUENTE: CB, ITESM, 2003

El maíz azul, por su color, se esperaba que tuviera gran cantidad de antocianinas, como lo informa la literatura (Ruíz, 1997). Se comprobó que el maíz azul es un alimento rico en antocianinas, pero sin isoflavonas, según análisis previos en HPLC.

La jamaica es el alimento con mayor contenido de antocianinas en las tres fracciones. El frijol 1, también es rico en estos pigmentos, en comparación con la variedad Perla, quien es deficiente en cuanto a contenido de antocianinas, pero las pocas que tiene son las que le dan el color negro al frijol.

En la técnica de cuantificación de antocianinas se utilizaron buffers con diferentes pH, donde se observaron mayor cantidad de antocianinas a un pH de 1,0 (Figura 17); debido a que las antocianinas presentan transformaciones estructurales reversibles. A pH 1,0 predomina su forma “*oxonium*” coloreada y a pH 4,5 la forma “*hemiacetal*” incolora.

Conforme aumenta el pH se pierde un protón, se gana una molécula de agua y se forma una pseudobase carbiol (las cuales son incoloras, por lo que existe una degradación de color conforme aumenta el pH) (Diaz Villegas, 1986)

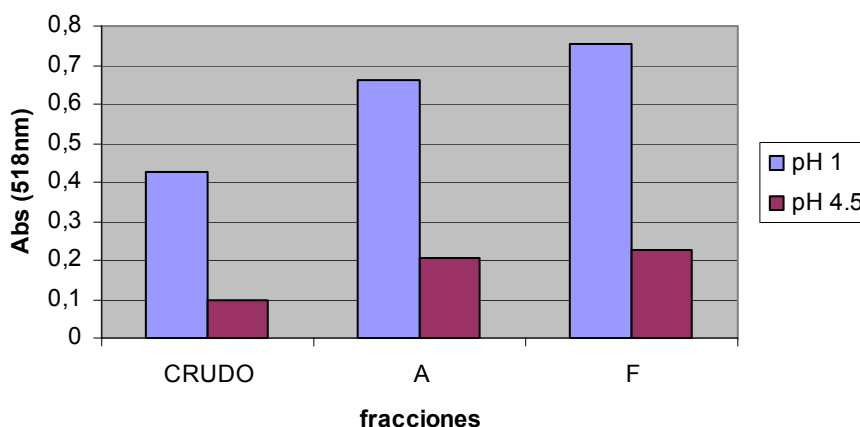


Figura 17. Valores de la presencia de antocianinas coloreadas a diferentes pH. Abs 518nm. Ejemplo tomado de los resultados de pH diferencial de la Jamaica.

A partir de las concentraciones de compuestos fenólicos y de antocianinas, en cada una de las muestras se pudo determinar la masa de compuestos fenólicos, en cada fracción de las diferentes muestras analizadas. En los cuadros 6 y 7 se pueden observar las diferencias entre la cantidad en mg, en cada una de las fracciones de compuestos fenólicos totales y antocianinas respectivamente.

Es importante considerar que la cantidad de masa por muestra utilizada inicialmente, no es la misma cantidad que entra en la columna a la hora del fraccionamiento. El peso de las testas utilizadas fue de 10g, donde en la fracción con mayor contenido de compuestos fenólicos (mg/g) fue el frijol 2, con una aproximación de 4,6mg/g, en la fracción más concentrada. Para 100g de maíz molido utilizados al inicio se obtuvo en la fracción cruda una cantidad de 0,1952mg/g de fenólicos totales y en la jamaica el contenido de fenólicos en 30gramos iniciales fue de 7,06mg/g.

Cuadro 6. Contenido en mg de los fenólicos totales en cada fracción del frijol, maíz y la jamaica.

Muestra	CRUDO (mg)	A (mg)	E (mg)	F (mg)	I (mg)	K (mg)
Frijol 1	36.55	14.58	0.59	0.87	0.21	0.21
Frijol 2	46.18	13.09	0.64	8.28	0.28	0.07
Jamaica	212.03	29.95	3.05	11.24	0.13	0.24
Maíz	19.52	5.84	0.72	2.69	0.11	0.03

FUENTE: CB, ITESM, 2003

Se debe considerar para la tabla siguiente que el volumen en la fracción cruda es el doble al de las otras fracciones, por lo tanto los resultados de la fracción cruda son el doble de la fracción A (Cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido de antocianinas monoméricas en cada una de las fracciones (mg) de las muestras analizadas

Muestra	CRUDO	A	F
FRÍJOL 1	3,37	1,68	0,94
FRIJOL 2	1,78	0,55	0,36
JAMAICA	10,33	6,16	3,32
MAÍZ	6,73	3,29	2,27

FUENTE: CB, ITESM, 2003

Durante este proyecto se realizaron varios fraccionamientos y se observó que los primeros resultados del fraccionamiento del frijol fueron muy bajos debido al exceso de agua y al tiempo de remojo, para el desprendimiento de las testas. Por lo que los experimentos posteriores se hicieron disminuyendo la cantidad de agua de remojo (Anexo 11).

Por lo tanto, en cuanto más agua se utilizó en relación a la masa de frijol, mayor será el efecto de lixiviación, pérdida del contenido.

Lo anterior comprueba que la cantidad de agua empleada en el remojo del frijol tiene efecto sobre la cantidad de compuestos fenólicos, que se pueden encontrar después de dicho proceso

V. CONCLUSIONES

1. De los solventes utilizados la acetona fue el más adecuado para la extracción de compuestos fenólicos.
1. La técnica de fraccionamiento por solubilidad es un método simple y rápido utilizado para la bioseparación de los compuestos fenólicos.
2. Las antocianinas son pigmentos que dan color a las frutas, flores y algunas verduras, como el azul a los granos del maíz azul y el negro a las testas del frijol. Se demostró con este proyecto que la flor de jamaica contiene gran cantidad de antocianinas, que le permiten obtener la coloración roja que ella presenta.
3. Existen diferencias en el contenido de compuestos fenólicos, entre variedades, de un mismo alimento. Ese es el caso de las dos variedades de frijol negro analizadas, el frijol 1 contiene una cantidad de cierto tipo de compuestos fenólicos mayor, que la que contiene el frijol 2.
4. En el agua de remojo se pierden compuestos fenólicos. En cuanto más agua se utilice en relación a la masa de frijol, mayor será el efecto de lixiviación.
5. La jamaica es la muestra de las analizadas con mayor cantidad de compuestos fenólicos, principalmente de antocianinas monoméricas.
6. La jamaica y al maíz azul no contienen isoflavonas.
7. El frijol 1 (Mx 332), contiene mayor concentración de antocianinas que el frijol 2 (Perla).

8. El frijol 2 (Perla) presentó gran cantidad de isoflavonas en comparación con las otras doce variedades analizadas.

9. El pH influye en la cuantificación de antocianinas ya que en la lectura espectrofotométrica altera la estructura y coloración de estos compuestos.

VI. RECOMENDACIONES

1. En la técnica del fraccionamiento es recomendable analizar con la prueba de Folin (cuantificación de compuestos fenólicos totales) las muestras B, C y D; como una reconfirmación de que no hay fenólicos totales en esas fracciones, pues se supone que quedaron atrapados en la columna.
2. Realizar biosíntesis *in vitro* de compuestos fenólicos sencillos, comenzando a través de un precursor común, el ácido Shikímico (Trease y Evans 1989)
3. Recomendar la inclusión de compuestos fenólicos en la dieta, para la protección de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) de la oxidación, y por lo tanto de la iniciación del proceso de arteriosclerosis.
4. Realizar bioensayos en células cancerígenas para comprobar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.
5. Hacer el mismo estudio y análisis en productos de mayor consumo a nivel mundial. Por ejemplo, en las variedades de frijol más consumidas en Costa Rica.
6. Determinar si en el proceso de cocción de estos alimentos, las concentraciones de fenólicos totales se ven alteradas.
7. Determinar mediante la técnica de HPLC, el tipo y la cantidad de compuestos fenólicos más comunes en las muestras.
8. Desarrollar un producto farmacéutico utilizando como base a los compuestos fenólicos extraídos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aberson, J. y Simon, M. 2001. Methods in Enzymology. Flavonoids and other polyphenols. Editorial Academia Press. Volumen 335. USA.
2. Alamo, M., Cortés, J. y Rodríguez, V. 2000. Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC con extracción en fase sólida. Editorial Universidad de Valladolid, Palencia. sp
3. Avilés, R. 2002. Comunicación personal con la Directora Ejecutiva del Consejo Latinoamericano de información Alimentaria, México, D:F
4. Cardador, A., Loarca, G. and David, B. 2002. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal: Agriculture and Food Chemistry. Volumen 50, páginas 6975-6980 6975. Queretaro, México
5. Castellanos, J. y Alleños, L. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, vol 47 n. 2. México, D.F.sp
6. Cisneros, M., 2003. Comunicación personal sobre metodología del fraccionamiento, y los compuestos fenólicos, ITESM, Mty, Mexico
7. Flores, J. 2000. Farmacología Humana. 3era edición. Masson. Barcelona. España.sp
8. Gerber M., 2001. Le soja, trésor de vie: propriétés nutritionnelles, épidémiologie. <http://museum.agropolis.fr/>.sp

9. Goldwyn S., Lazinsky A., Wei H., 2000. "Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns". Drug metabolism and drug interactions; Vol 17, Nº1-4. E.U. sp
10. Gómez, A., Garro, F. y Arias, Z. 2000. Estudio del color en vinos de la denominación de origen Ribera de Guadiana. Colombia. sp
11. Guisell, A., 2000. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. vol 50N3. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes Mérida. Venezuela.sp
12. Hoff, E. and Janick, J., 1975. Los Alimentos, Cuestiones de Bromatología, Aspectos químicos, biológicos, Agropecuarios y sociales. Scientific American. Hermann Blue, Madrid, España.sp
13. Jaworski, W., and Lee, Y., 1987. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. Journal Agric. Food Chem. 35:249-51. USA.
14. Kafui, K., Adomt and Rui H., sf. Antioxidant Activity of Grains. Journal Agriculture and food Chemistry, New York, E.U.sp.
15. Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Segunda Edición. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. 455pp
16. López, X. 2001. Antioxidantes. Revista Nutricional. .Santiago de Compostela. Chile. sp
17. Maldonado, L., 2002. Contenido de Flavonoides en propóleos Argentinos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina. sp

18. Marcano, D. y Hosegawa, M., 1991. " Fitoquímica Orgánica", Universidad Central de Venezuela, Caracas.sp.
19. Martínez, A., 2000. Flavonoides: unos amigos del corazón. Facultad de Ciencias farmacéuticas de la Universidad de Antioqui, Medellín. sp
20. Martínez, F., sf. Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. Revista Enologia. Universidad de La Rioja, Logroño. Sp.
21. [Martínez, I.](#); [Periago, M.](#); [Ros, G.](#) 2000. [Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos latinoamericanos de nutrición volumen. 50 N° 1, p5-18](#)
22. Mata, R., 2003. Comunicación personal. Bioquímico del ITCR. Características fisicoquímicas de ciertos solventes orgánicos.
23. Melecchi. M. Martínez, M., 2002. Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers: A study of extraction methods. Nascimento F, Caramão, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p90160-970, Brasil.
24. Montgomery, Conway, Spector, Chappel, 1998. Agentes antioxidantes. Bioquímica. Sexta edición. Editorial Harcourt Brace, México, D:F. p343
25. Morales, E., 1990 El frijol soya en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. sp
26. Murray, R.; Mayes, P.; Granner, D. y Rodwell, V. 1997. Bioquímica De Harper. Manual Moderno. 14 edición. México, D.F. p 678.

27. Pérez, G., 2003. Flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana Invest Biomed 2003;22(1). Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Habana, Cuba.
28. Potter, M., Baum, A., Teng H., Stillman N., Shay F. And Erdman Jr W., 1998. "Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal woman". Am. J. Clin. Nutr., 68: 1375S-1379S.
29. Quesada, F.s. *Zea mays*. Valor nutritivo. Revista: Sistemas de información de recursos de Pienso. p552
30. Reyes, C. y Paredes, O., 1993. Hard to cook Phenomenon in common beans. A review. CRC. Crit Rev in Food Sci and Nutr, 33:227-286.
31. Rickard E. and Thompson U. 1997. "Phytoestrogens and lignans: effects on reproduction and chronic disease". Antinutrients and Phytochemicals in food, 662 : 273-293.
32. Rodríguez, A. and Marion, R. 2003. Nueva base de datos acerca de los flavonoides. Científicos del Departamento de Epidemiología y Bioestadística de la Universidad de Róterdam, Holanda.sp
33. Rojas, R. 1999-2000, *Hibiscus sabdariffa* L. Publicación semanal de Editorial Perfil S.A.sp
34. Ruiz, A. 1997 El maíz azul (*Zea mays*) Sophia University, Consulta en: ruiz@sophia.ac.jp<http://pweb.sophia.ac.jp/~a-ruiz>. Tokio.sp
35. Sauza and Sáenz, A., 2000. Compuestos Fenólicos. Texas Food S.A de C.V. Texas, E.U.sp.

36. Setsehll, R., Borriello, P., Hulme, P. and Axelson, M. 1984. Non-steroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr*; 40:569-578.
37. Sikorsk, Z.E., 1997. Chemical and Funciontional Properies of Food Components. *FOOD SCIENCE*. Technical University of Gdansk, Poland. New Hallond, USA. pp 293
38. Starke-Reed, P., 2003. Antioxidantes. *Nutrición del Instituto Nacional de Estudios sobre el Envejecimiento*. Maryland, Estados Unidos.
39. Torgils Fossen, Rune Slimestad, and Oyvind M. Andersen, 2001 *Anthocyanins from Maize (Zea mays) and Reed Canarygrass (Phalaris arundinacea)*. Department of Chemistry, University of Bergen, Alle´gt. 41, N-5007 Bergen, Norway and Polyphenols AS.
40. Tsaia J., McIntoshb, J., Pearceb, P., Camdenb B., Jordanc B.R., 2001. *Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (Hibiscus Sabdari.a L.)*.NY. Estados Unidos. sp
41. Tyler, V.E. 1994. "Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals". USA.sp
42. Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y., 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208 : 124-130.
43. Wrolstand, R., 2000. *Characterization and Measurement of Anthocynins by UV-visible Spectroscopy*. Food Analytical Chemistry. Oregon State University. Oregon, E.U.

VIII. ANEXOS

Anexo 1.

Cuadro 1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

COMPUESTOS FENÓLICOS	TIPOS
1. Compuestos Fenólicos Simples	C_6C_1 , C_6C_2 , C_6C_3
2. Flavonoides	Chalconas y flavonas Flavonoles y flavonas Antocianinas Flavononas y flavonoles Flavonoles
3. Chalconas y flavonas	Flavonoles y flavonas Antocianinas Flavononas y flavonoles Flavonoles
4. Isoflavonoides	isoflavonas Isoflavononas Rotenoides Isoflavanos e isoflavenos
5. Quinonas	Benzoquinonas Naftoquinonas Antraquinona Bis- antraquinona
6. α -Pironas	cumarinas Isocumarinas Aflatoxinas
7. γ - Pironas	cromanos y cromonas Canabinoides
8. Xantonas	
9. Lignoides	
10. Dépsidos	
11. Otros policétidos aromáticos	

**Rodríguez, A., Marion, R., 2003.

Anexo 2.

Figura 1. Diferentes tipos de Sep Pak como columna de fase reversa.



Figura 2. Forma de cómo utilizar el Sep Pak, en la técnica del fraccionamiento

Anexo 3.



Figura 3. Primeros lavados de la extracción de compuestos con diferentes solventes

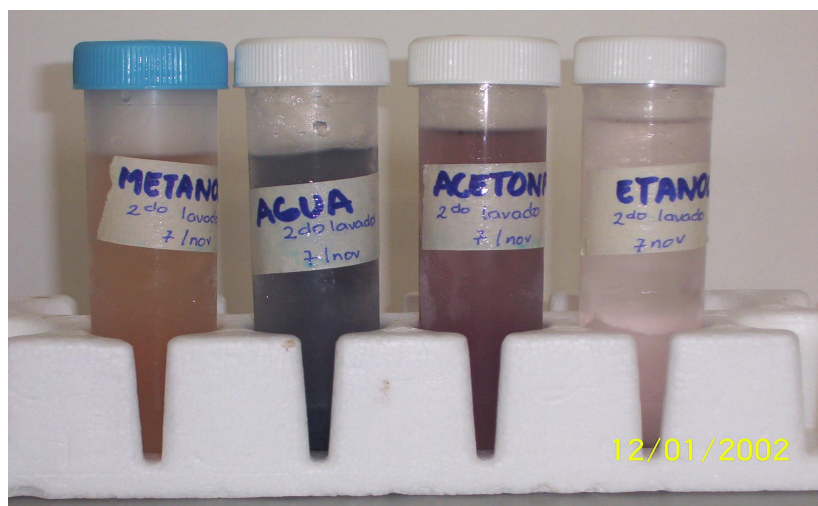


Figura 4. Segundo lavado en la extracción de compuestos con diferentes solventes

Anexo 4.

Figura 5. Resultado final de la extracción de compuestos fenólicos, después de los cuatro lavados con diferentes solventes

Anexo 5

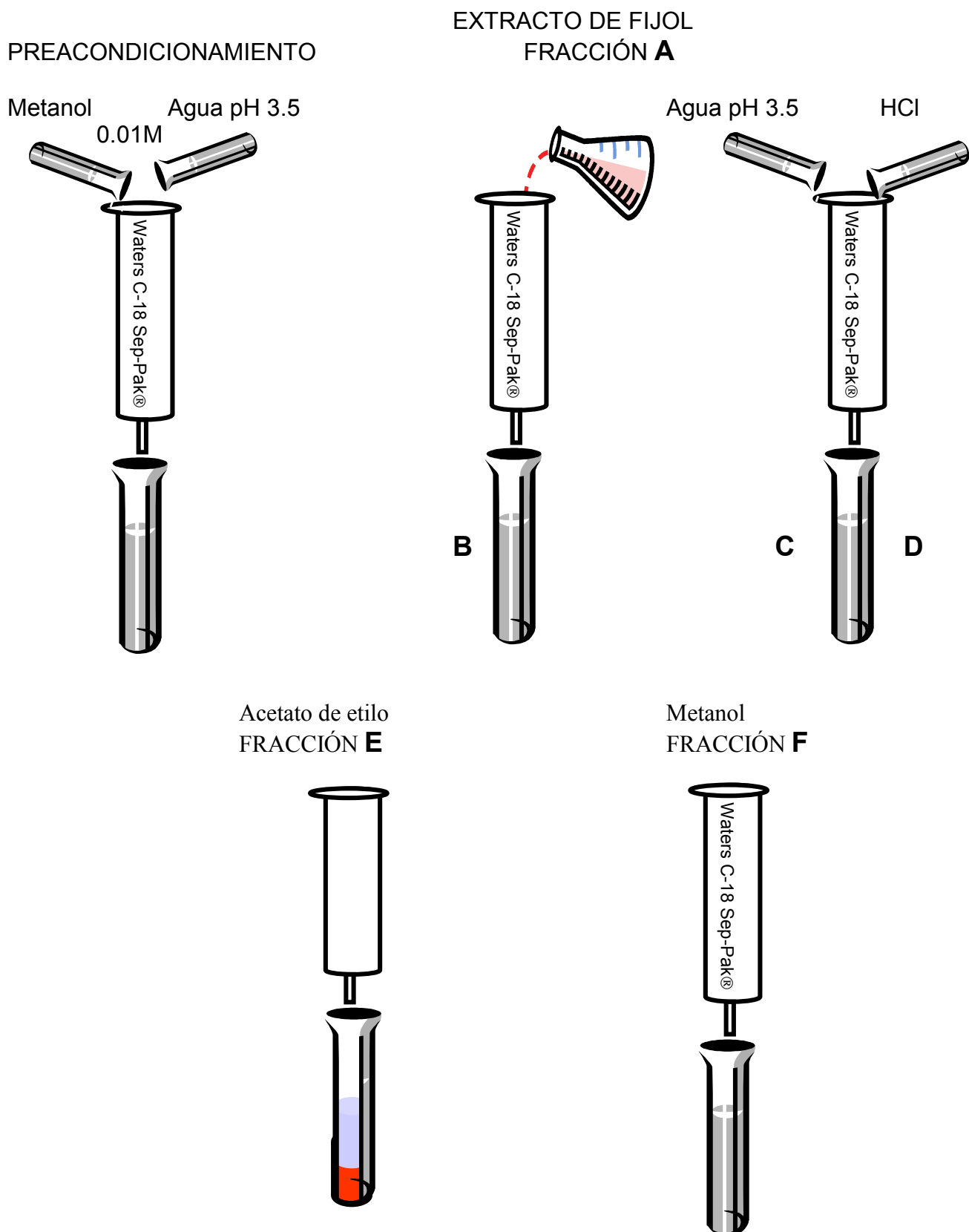
Cuadro 2. Secuencia de los reactivos utilizados en el Sep Pak, en la técnica del fraccionamiento

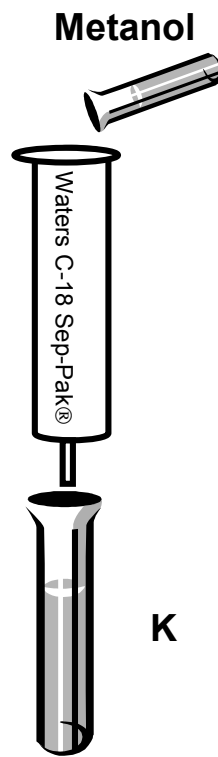
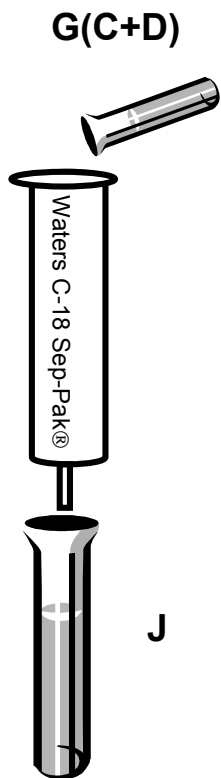
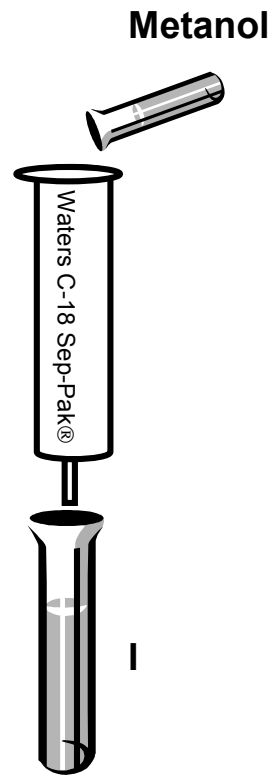
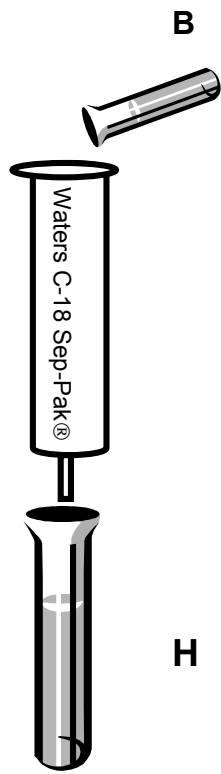
REACTIVO	FRACCIÓN	USO
Acetona	Crudo	Separación de componentes de la muestra
Éter	A	Extracción de los compuestos no polares
Muestra (sin éter)	B	Retención de los compuestos fenólicos en la columna
Agua pH 3.5	C	Primer lavado
HCl 0.01M	D	Segundo lavado
Acetato de etilo	E	Eluyente de flavonoides
Metanol	F	Recuperación de antocianinas (resto de compuestos fenólicos)
C+D	G	Unión de los lavados para iniciar una reconfirmación
B	H	Primera reconfirmación
Metanol	I	Extracción de posibles fenólicos, retenidos en el primer lavado
G	J	Segunda reconfirmación
Metanol	K	Extracción de posibles fenólicos, retenidos en el segundo lavado

FUENTE: CB,ITESM, 2003

Anexo 6.

Esquema del fraccionamiento, para la obtención de los compuestos fenólicos





Anexo 7.

Resultados de la coloración de las diferentes fracciones

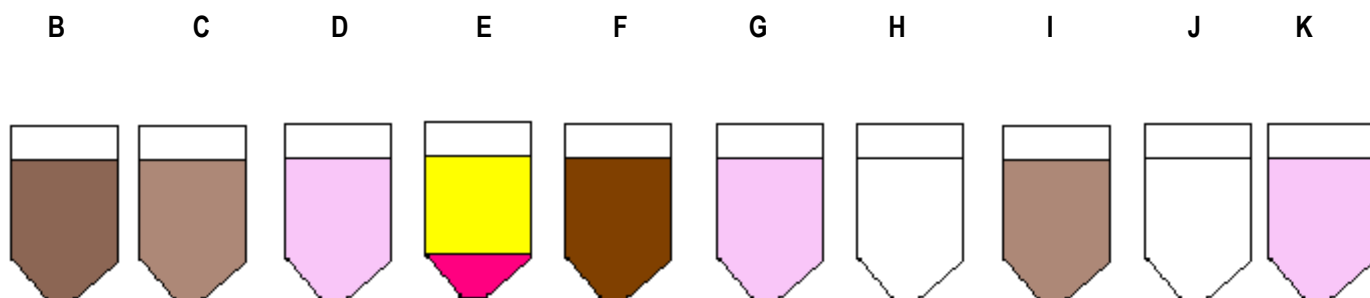


Figura 6. Coloración de las diferentes fracciones



Figura 7. Coloración obtenida del fraccionamiento del frijol negro

Anexo 8.

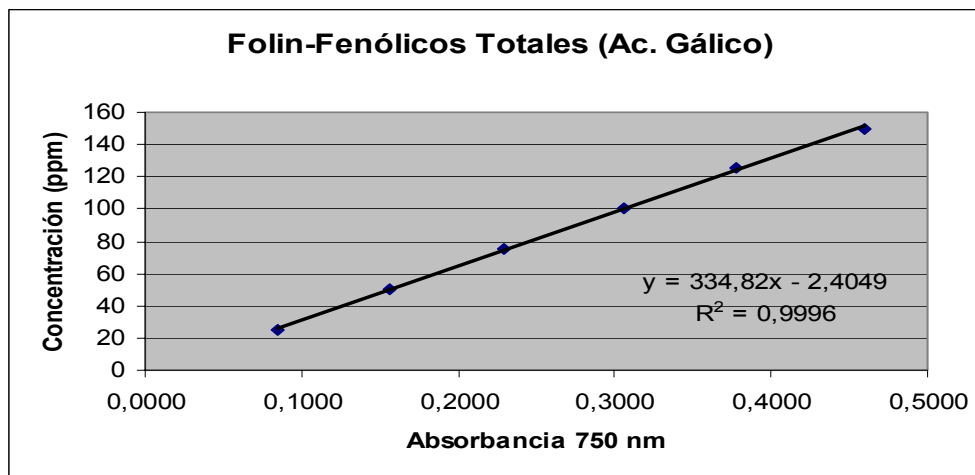
Fórmulas para la determinación de fenólicos totales

Esta técnica se utiliza para la cuantificación de los fenólicos totales en cada fracción, este procedimiento fue descrito por Aberson, J.; Simon, M., 2001. Extraída del libro *Methods in Enzymology*, vol 335. (Ver la referencia en bibliografía). Antes de averiguar la concentración de cada muestra se realizó una curva de calibración con ácido Gálico.

La fórmula que se utilizó para averiguar la concentración de fenólicos totales se determino por la curva de calibración.

$y = 321.52x + 1.009$ Esta formula para las muestras están disueltas en agua.

Y para las muestras disueltas en metanol: $y = 334.82x - 2,404$



FUENTE: CB, ITESM, 2003

Anexo 9

CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

Fórmula 1. Se utilizó para calcular la absorbancia de la dilución preparada con el Buffer pH 1,0 (Wrolstand, R., 2000)

$$A = (A_{\lambda \text{ vis max}} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda \text{ vis max}} - A_{700})_{pH4.5}$$

Donde:

A : Absorbancia total de antocianinas

$A_{\lambda \text{ vis max}}$: Absorbancia a la Longitud de onda máxima visible. Varía para cada especie

$A_{700 \text{ pH}1.0 \text{ ó } \text{pH}4.5}$: Es la longitud de onda de 700nm a la cual también se lee la muestra a los diferentes pH

Fórmula 2. Se utilizó para calcular la concentración de antocianinas monoméricas de la muestra (Wrolstand, R., 2000)

$$\text{Antocianinas monoméricas en mg/l} = (A * MW * DF * 1000) / (\epsilon * l)$$

Donde:

A : absorbancia total de antocianinas

MW : Peso molecular de la antocianina más predominante en la muestra

DF : Factor de dilución

(Wrolstand, R., 2000)

Anexo 10

Buffers utilizados en la técnica de pH diferencial

- **Buffer de Cloruro de Potasio (0.049M, pH1.01)**

KCl =3.72g

Volumen =1 000 ml (aforar con agua destilada y después ajustar el pH con HCl concentrado)

- **Buffer de Acetato de Sodio (0.4M, pH4.5)**

Acetato de Sodio = 54.43g

Volumen: 1000ml (aforar con agua destilada después de ajustar el pH a 4.5, con HCl concentrado)

- **Buffer de Citrato (0.02 M, pH 3.5)**

Acido cítrico monohidratado = 1.924g

Volumen : 500ml

NaOH : 1Normal

Anexo 11.

Frijoles en remojo



Figura 8. Frijol negro de la variedad Perla, después de 1 día de remojo

Anexo 12.

Técnica del fraccionamiento, técnica de prueba y error



Figura 9. Repeticiones a la técnica del fraccionamiento

Anexo 13.

Equipo utilizado para la cuantificación de los fenólicos totales



Figura 10. Espectrofotómetro



Figura 11. Rotavapor

Anexo 14.

Contenido de fenólicos totales en cada una de las muestras

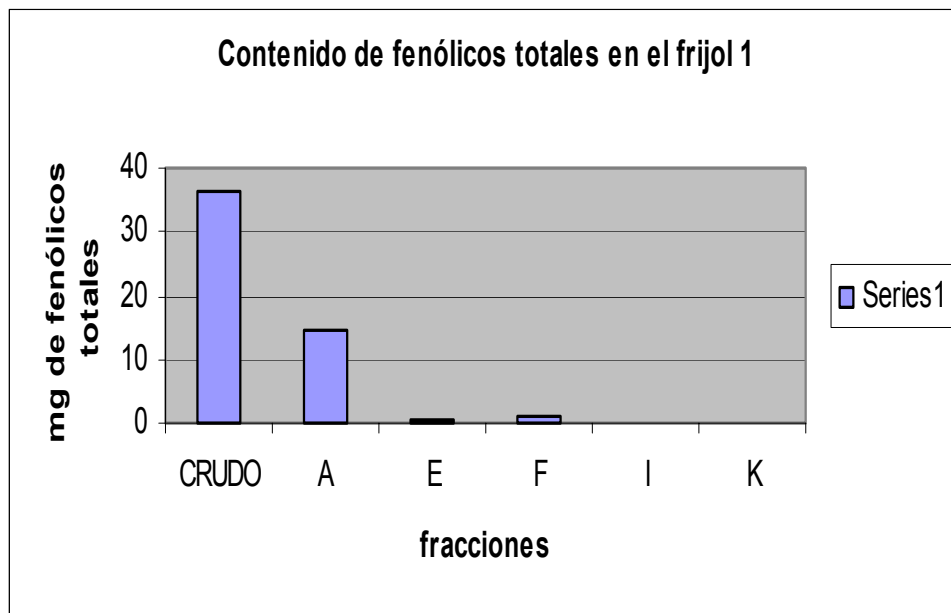


Figura 12. Contenido de fenólicos totales en el frijol 1 (Mx332)

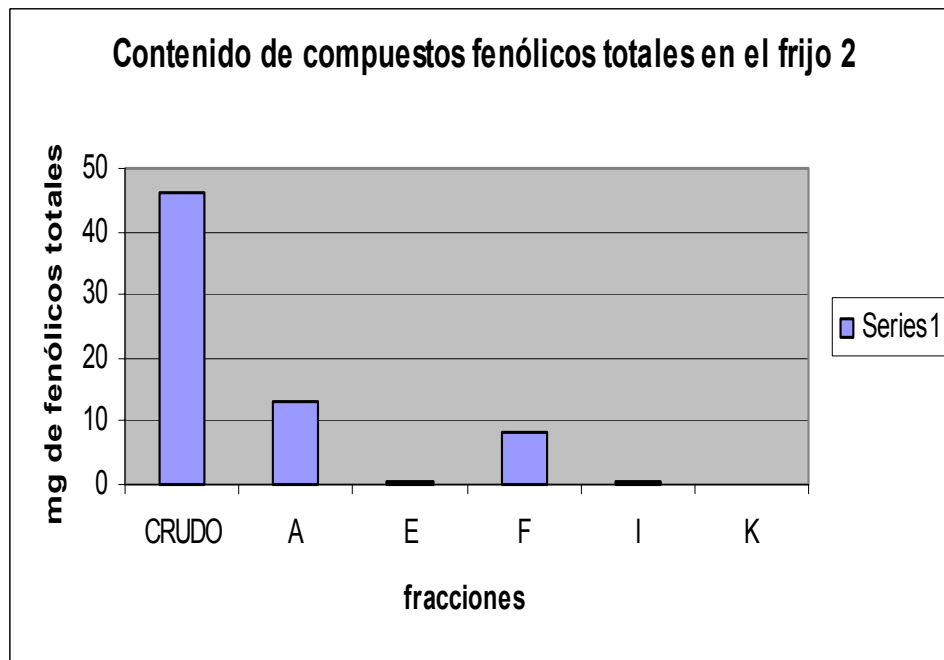


Figura 13. Contenido de fenólicos totales en el frijol 2 (Perla)

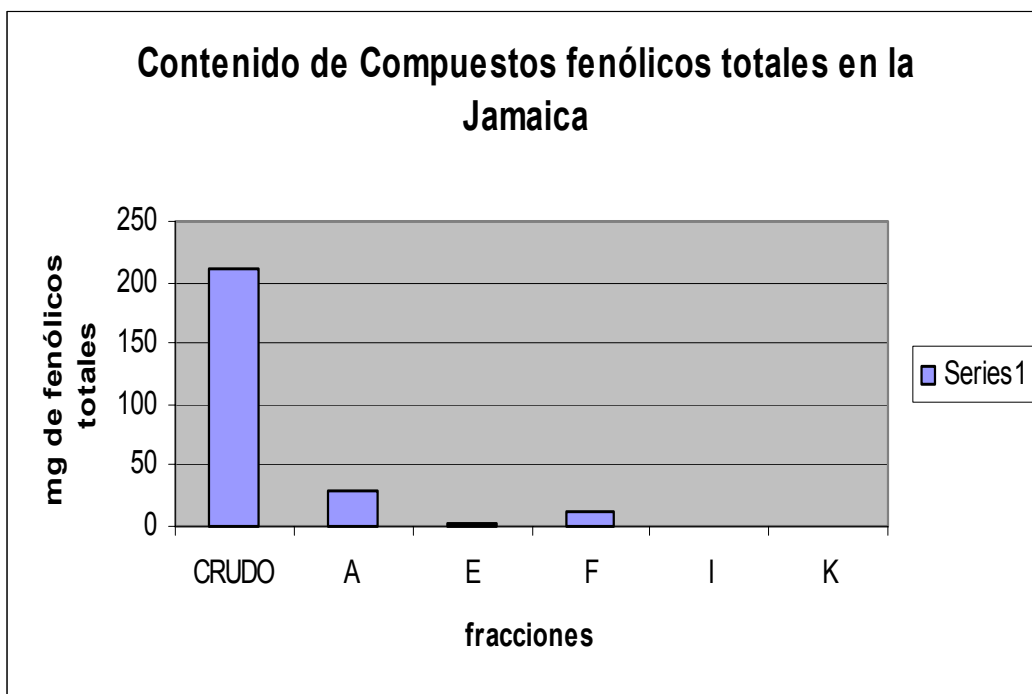


Figura 14. Contenido de compuesto fenólicos totales en la Jamaica

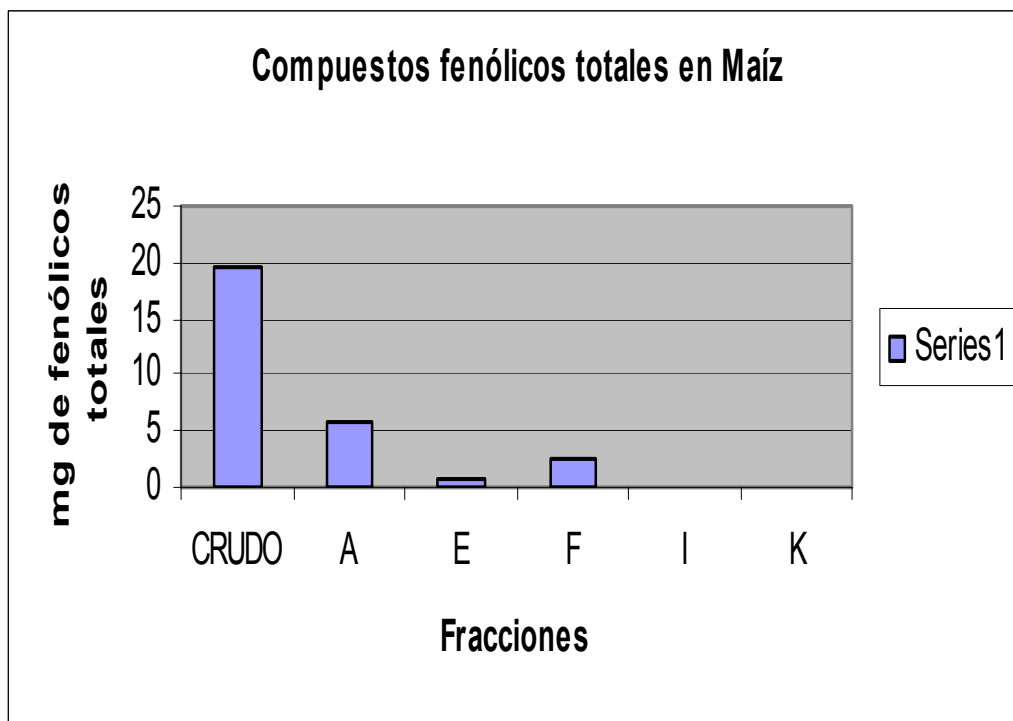


Figura 15. Contenido de fenólicos totales en el maíz

Anexo 15.

Contenido de antocianinas en cada una de los alimentos a los que les extrajo

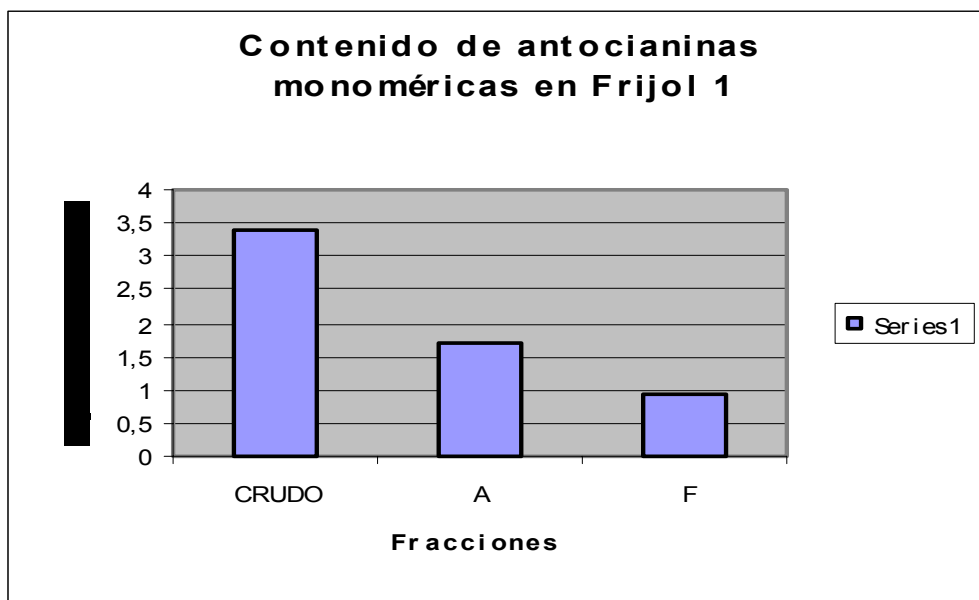


Figura 16. Contenido de antocianinas en el frijol 1 (Mx 332)

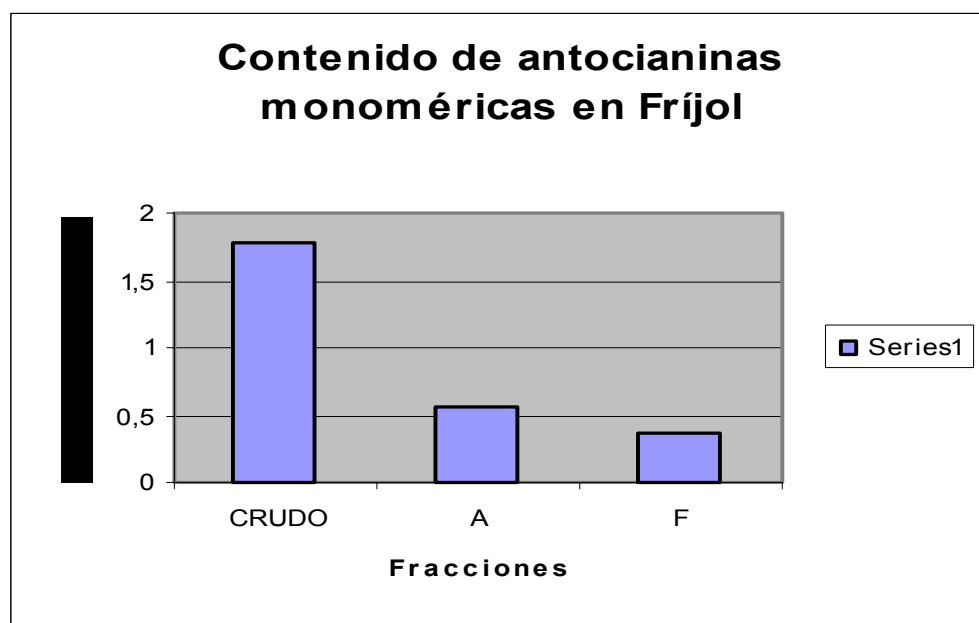


Figura 17. Contenido de antocianinas presentes en el frijol 2 (Perla)

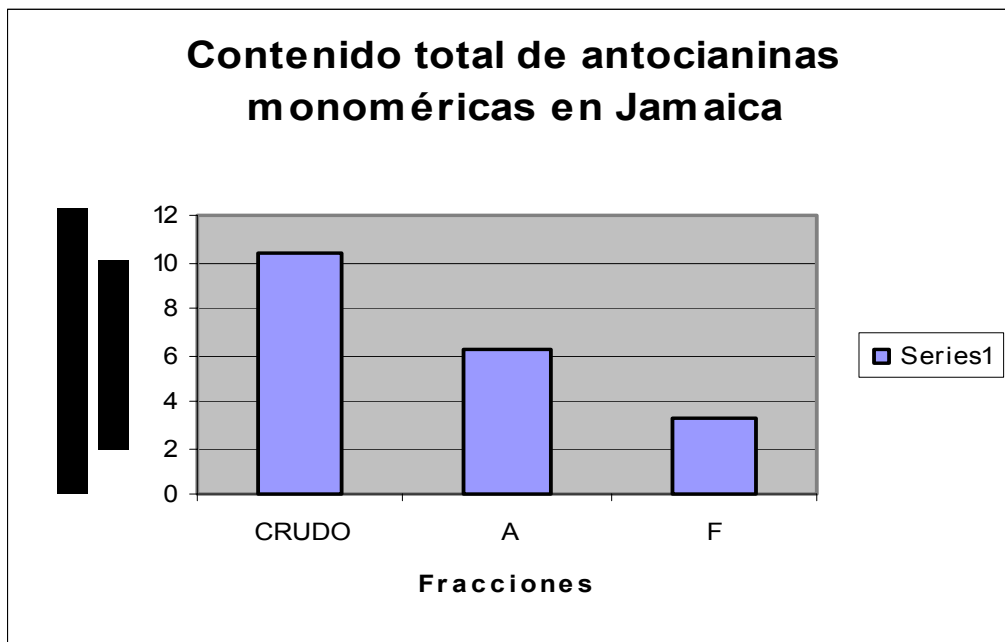


Figura 18. Contenido de antocianinas presentes en la Jamaica

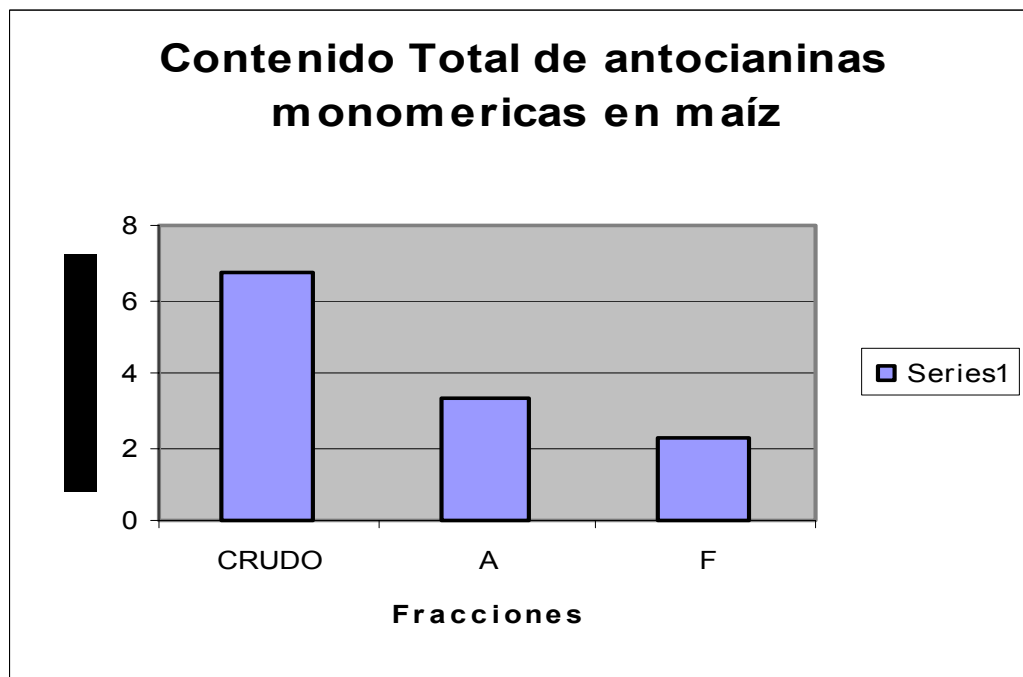


Figura 19. Contenido de antocianinas presentes en el maíz azul