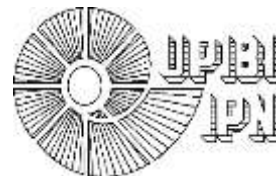




INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



“Caracterización de extractos de vaina de frijol y
evaluación de su capacidad antioxidante”

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

VARGAS JUAN RODRIGO

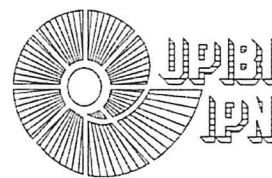
DIRIGIDA POR:

Dra. Ana Belem Piña Guzmán

Ciudad de México, a 07 de Junio del 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 07 de junio del 2019, siendo las 11:00 am se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: "Caracterización de extractos de vaina de frijol y evaluación de su capacidad antioxidante" que presenta el alumno Vargas Juan Rodrigo con número de boleta 2011620131, aspirante a Ingeniería en Biotecnología


Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

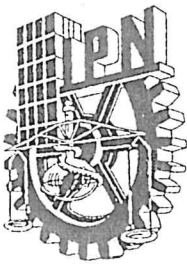
COMISIÓN REVISORA.


Ana Belem Pina Guzman
Nombre y firma Director


DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
Nombre y firma Evaluador


Yolanda Gomez y Gomez
Nombre y firma Evaluador


Cesar Aguirre Jimenez Sierra
Nombre y firma
Director de Programa Académico

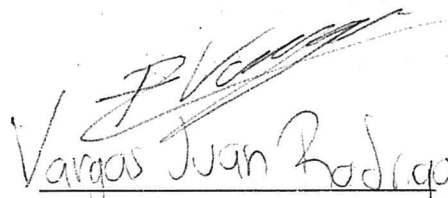


*INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA*

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 7 del mes junio del año, el que suscribe Vargas Juan Rodrigo alumno del Programa de INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA con número de boleta 2011620131, adscrito a la UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo, bajo la dirección de Dra. Ana Belem Piña Guzmán y cede los derechos del trabajo intitulado Caracterización de extractos de vaina de frijol y evaluación de su capacidad antioxidante, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rodrigovargas.upibi@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Vargas Juan Rodrigo

Nombre y firma

Agradecimientos

Agradezco a la Dra., Ana Belem Piña Guzmán por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez por la amabilidad y disposición en este proyecto.

Agradezco al Dr. Gustavo Valencia del Toro por su disposición, atención y comprensión.

Agradezco a mis padres por el amor y paciencia al realizar mi carrera.

Agradezco a mi familia por ser buen ejemplo, otorgarme los medios para poder continuar estudiando y animándome a ser yo mismo.

Agradezco a mis amigos principalmente a Miguel, Luis, Roberto y Lucero, estos me ayudaron en mi desarrollo personal y social.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Evelia, Francisco, Gustavo, Mauricio, Itzel, Rose, Alejandra y Estela.

Agradezco a todas las personas que conocí en esta etapa de mi vida y me motivaron a seguir.

A todos muchas gracias.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	3
2.1 Oxidación celular	3
2.2 Mecanismos de oxidación	3
2.2.1 Radicales libres (RL)	3
2.2.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	4
2.3 Antioxidantes	4
2.3.1 Mecanismos de defensa antioxidante	5
2.3.1.1 Antioxidantes primarios	5
2.3.1.2 Antioxidantes secundarios	6
2.4 Determinación de la actividad antioxidante	7
2.5 Fitoterapia y fitofármacos antioxidantes	8
2.6 Producción de frijol en México y la vaina de frijol como residuo	8
2.7 Composición química y sus propiedades de la Vaina de frijol (<i>phaseoli pericarpium</i>)	9
2.8 Antecedentes de vaina de frijol (<i>Phaseoli pericarpium</i>)	10
2.9 Antecedentes de los estudios realizados en la Unidad Profesional Interdisciplinaria en Biotecnología	11
3. Objetivos	12
3.1 Objetivo general	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. Justificación	13
5. Metodología	14
5.1. Estrategia experimental	14
5.2. Acondicionamiento de la vaina de frijol	15
5.3. Obtención de extractos	15
5.4 caracterización de los extractos	16
5.4.1. Determinación de pH	16
5.4.2. Determinación de sabor	16
5.4.3. Determinación de olor	17

5.4.4. Determinación de color	17
5.4.5. Determinación de conductividad.....	17
5.5. Fitoquímica de la vaina de frijol.....	17
5.7. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto.....	17
5.7.1. Preparación de soluciones.....	17
5.7.2. Ensayo DPPH.....	18
5.7.3. Ensayo ABTS	18
6. Resultados.....	19
6.1. Rendimiento	19
6.2. Caracterización del extracto.....	19
6.3. Pruebas fitoquímicas.....	20
6.4. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo	21
DDPH.....	21
6.5. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo ABTS	24
6.6. Determinación de la IC ₅₀ del ensayo DPPH y ABTS.....	26
7. Discusión	28
7.1. Extracción	28
7.2. Caracterización y fitoquímica	28
7.3. Capacidad antioxidante extractos	29
8. Conclusiones.....	32
9.Referencias	33

Índice de figuras

Figura 1. Estrategia experimental.....	14
Figura 2. Separación, selección y lavado de vaina de frijol.....	15
Figura 3. Montaje de sistema soxhlet y rotavapor hahnvapor	16

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento de extractos.....	19
Tabla 2. Caracterización de extracto.....	19
Tabla 3. Fitoquímica de los extractos de vaina de frijol.....	20
Tabla 5. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acético.....	22
Tabla 6. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto etílico.....	23
Tabla 7. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acuoso.....	23
Tabla 8. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto hexánico.....	24
Tabla 9. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acético.....	25
Tabla 10. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto etílico.....	25
Tabla 11. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acuoso.....	26
Tabla 12. IC ₅₀ de los extractos de la vaina de frijol por el método DPPH y ABTS.	27

Resumen

Las plantas o parte de ellas contienen compuestos activos los cuales se ha utilizado para prevenir o aliviar síntomas de algunas enfermedades, como la diabetes, el cáncer, infecciones bacterianas o como suplementos alimenticios por sus efectos antioxidante y probiótico.

La vaina de frijol (Phaseoli pericarpium) es el residuo generado de la cosecha del frijol común, del cual anualmente se producen aproximadamente 20 millones de toneladas a nivel mundial. Dicho residuo no posee valor agregado, por lo que su utilización como fuente de metabolitos con propiedades farmacológicas es una opción alternativa a su desaprovechamiento.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante de los metabolitos de la vaina de frijol extraídos mediante agua y solventes orgánicos hexano, acetato de etilo y etanol. Se realizó un análisis preliminar fitoquímico para analizar los posibles compuestos presentes en cada extracto. La capacidad antioxidante se evaluó mediante las pruebas colorimétricas DPPH y ABTS.

Se evidencio la presencia principalmente de compuestos fenólicos en los cuatro extractos, el extracto etanólico mostró la mayor actividad antioxidante inhibiendo hasta un 98% del radical. Con dichos resultados nos arrojan la suficiente información para evidenciar el potencial de la vaina como fuente de fitofármacos.

1. Introducción

La medicina herbolaria ha tenido un rol importante en la salud, se ha utilizado desde tiempos antiguos y varía de acuerdo con la cultura de cada país. Desde hace una década se ha incrementado el uso de productos de medicina tradicional. Esto ha generado interés en el estudio, uso y regulación de los componentes de las plantas (WHO, 2005).

Entre los productos de origen vegetal que benefician al consumidor, se llaman fitofármacos aquellos “productos medicinales acabados y etiquetados, cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales” (Pérez & Hernández, 2014).

Los fitofármacos tienen diferentes acciones terapéuticas como: antidiaforética, diurética, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antimicrobianos, antiespasmódica, antidiabética, entre otras.

Existen por lo menos 100 enfermedades que tienen relación con el desbalance del estrés oxidativo y pueden generar complicaciones a largo plazo. En este grupo se incluye la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las afecciones gástricas, respiratorias y del sistema endocrino. Una forma de prevención o control para estas enfermedades es el consumo de antioxidantes (Coronado *et al.*, 2015).

El conocimiento de las características (físicas, químicas, organolépticas, fitoquímicas, etc.) y de la actividad biológica de los materiales vegetales, permite su aprovechamiento como recurso Fitoterapéutico. Por lo anterior, en este trabajo se pretende caracterizar los diferentes extractos de la vaina de frijol proveniente del municipio de Villa Guerrero, explorando su potencial capacidad antioxidante con el fin de proponer el uso de dicho recurso residual para la obtención de un posible fitofármaco.

2. Marco teórico

2.1 Oxidación celular

El proceso de óxido-reducción consiste en el acoplamiento de dos momentos básicos: la oxidación que implica pérdida de electrones y la reducción que significa ganancia de electrones. Así el oxidante se reduce al reaccionar con aquella molécula que oxida. Este proceso es cotidiano en el organismo humano y representa el conocido par óxido-reductor o balance redox. Un importante donador o ganador de electrones es el oxígeno, el cual es indispensable en la obtención de energía aerobia (respiración celular), por su participación se obtiene una buena cantidad de energía (ATP) utilizada para la función del organismo (Coronado *et al.*, 2015).

2.2 Mecanismos de oxidación

Irónicamente, el oxígeno que es indispensable para la vida bajo ciertas condiciones puede ser muy perjudicial para el cuerpo humano. Al reaccionar con algún otro elemento presente puede formar grupos químicos altamente reactivos con uno o más electrones desapareados, los llamados radicales libres. Estos compuestos son generados constantemente por las células como consecuencia de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en la cadena respiratoria, en la fagocitosis y mediante el sistema citocromo P450. En las reacciones no enzimáticas son generadas por las mitocondrias, fagocitos, xantina oxidasa, peroxisoma, ejercicio, inflamación e isquemia (la disminución de la sangre a través de las arterias) (Bagchi & Puri, 1998).

2.2.1 Radicales libres (RL)

Los seres vivos aerobios necesitan oxígeno para generar energía. El oxígeno puede reaccionar con otros elementos químicos, produciendo radicales libres (RL). Estas sustancias son especies químicas que contienen uno o más electrones

desapareados en su órbita externa. Son inestables y muy reactivas, ya que una vez formadas pueden captar un electrón de otras moléculas cercanas.

Si los RL no son desactivados, su reactividad química puede dañar macromoléculas, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Como consecuencia de ello, se produce un deterioro de la homeostasis de la célula y la aparición de diferentes enfermedades crónicas, e incluso la muerte celular. Los efectos nocivos de los radicales libres se han relacionado con la formación de cataratas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc., (Bagchi & Puri, 1998).

2.2.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La toxicidad de cada radical o especie oxigénica reactiva viene determinada, desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas: la reactividad, la especificidad, la selectividad y la difusibilidad. Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son: $O_2^{\cdot-} < H_2O_2 < OH$. Las tres entidades químicas son capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen, incluso con capacidad de atravesar membranas celulares

Entre las especies oxigénicas reactivas cabe destacar los radicales libres como el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno. Un segundo grupo de ROS lo constituyen los no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$). Estos compuestos por sí mismos no son reactivos, pero en presencia de metales de transición como el Fe o Cu u otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y generan radicales libres (RL).

2.3 Antioxidantes

Las sustancias que evitan inhiben o retrasan la oxidación de algún sustrato oxidable son llamadas antioxidantes. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, versatilidad y variabilidad operativa, para poder combinarse con una importante variedad de radicales libres (San-Miguel & Martín-Gil, 2009).

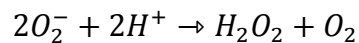
2.3.1 Mecanismos de defensa antioxidante

El organismo vivo necesita protegerse de los radicales libres producidos por el mismo metabolismo celular y los antioxidantes que protegen el cuerpo son principalmente de dos tipos: los antioxidantes endógenos y antioxidantes exógenos, por último, un tercer grupo que se les denomina sistemas reparadores (Quintanar & Calderón, 2009).

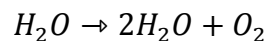
2.3.1.1 Antioxidantes primarios

Son la primera línea de defensa frente a los radicales libres, su principal acción radica en la función de tres enzimas: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

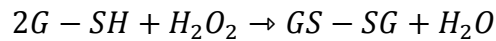
Superóxido dismutasa (SOD): En las células se encuentra como una familia de metaloenzimas de alta eficiencia catalítica que eliminan O_2^- . Cataliza la reacción de dismutación donde una molécula de O_2^- se oxida hasta O_2 molecular, mientras que la otra se reduce.



Catalasa: Cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O , se encuentra difundida en todos los órganos, especialmente en el hígado y en eritrocitos, localizada principalmente en los peroxisomas. Es una hemoproteína tetraédrica en la que el átomo de hierro realiza el intercambio redox, con una alta eficacia catalítica.



Glutatión peroxidasa (GPX): Cataliza la reacción de una gran variedad de peróxidos (incluido el H_2O_2) con ayuda de un sustrato aceptor de hidrógeno. En este caso, el glutatión reducido GHS actúa como reductor y posteriormente es regenerado por la glutatión reductasa.



La eficacia de esta triada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de estas especies oxigénicas e impedir la interacción de estas entre sí o con metales de transición para dar lugar especies de mayor reactividad. Sus concentraciones están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente a factores de transcripción que detectan cambios a nivel de estrés oxidativo.

2.3.1.2 Antioxidantes secundarios

Son compuestos que provienen de fuentes externas al organismo y por lo general se obtienen a partir de la dieta. Ejemplos de este tipo de elementos son:

La vitamina C o ácido ascórbico: Antioxidante hidrofílico. Es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en una concentración muy elevada en numerosos tejidos y plasma. Reacciona con diferentes especies reactivas de oxígeno como: O_2^- , OH , H_2O_2 y ROO se sabe que los niveles apropiados de vitamina C reducen drásticamente el daño oxidativo y proteinuria en animales.

La vitamina E o alfa-tocoferol: Antioxidante secuestrador de radicales libres lipofílicos. Se conocen 8 homólogos esta vitamina, de este el D alfa tocoferol es el que muestra más actividad biológica. La actividad antioxidante se debe a su carácter reductor otorgada por su grupo hidroxilo cromanol, impide el daño oxidativo de las membranas celulares, también amortigua el efecto de el en superóxido y controla la fluidez de la membrana.

Los carotenoides: Son pigmentos orgánicos que tienen actividad antioxidante a bajas concentraciones parciales de oxígeno excitado y atómico, principalmente protegen a las membranas biológicas.

Los compuestos fenólicos: Su actividad antioxidante resulta de la combinación de sus propiedades quelantes de transición y secuestradoras de RL. Además, actúan

en la inhibición de enzimas como las oxidasas, lipooxigenasas, mieloperoxidasas, NADPH y xantinoxidasa, evitando la formación de ERO e hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, estimula la acción de enzimas antioxidantes como la catalasa y el superóxido dismutasa (San-Miguel & Martin-Gil, 2009).

2.4 Determinación de la actividad antioxidante

Existen diferentes formas de evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y de plantas medicinales y se han desarrollado diversas técnicas *in vivo* e *in vitro*. Las técnicas *in vitro* consisten en determinar la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. Las técnicas *in vitro* nos dan un aproximado de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. (Kuskoski *et al.*, 2005).

Algunos métodos ampliamente usados como el ABTS y el DPPH se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos transferencia de átomos de hidrogeno (estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno) y transferencia de electrones (transferir un electrón y reducir un compuesto).

DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Se basa en la habilidad para atrapar radicales presentes en el medio. La molécula de DPPH• se caracteriza por ser un radical libre estable, que en disolución metanólica presenta un color violeta intenso con una fuerte absorción a 515 nm. Cuando la solución de DPPH• se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (antioxidante), reduce al radical DPPH• con la pérdida del color violeta, el cual es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture, tornándose de violeta a un amarillo pálido

ABTS• (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio). Se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical catiónico de color verde azulado ABTS•+ se genera por la interacción del ABTS con

persulfato de potasio. El radical ABTS•+ es un compuesto estable y soluble en metanol. Por lo tanto, se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical (Pérez Nájera et al, 2013).

2.5 Fitoterapia y fitofármacos antioxidantes

La fitomedicina o también conocida como fitoterapia, se define como la aplicación terapéutica de principios activos de origen vegetal, se fundamenta en el conocimiento científico moderno para prevenir, curar o anular estados patológicos. Esta terapia está basada en la farmacología y terapéutica moderna. Un fitofármaco es un extracto vegetal, normalizado y estabilizado, del cual se conoce su acción terapéutica (Hernández & Chávez, 2014)

Las plantas contienen fitocompuestos que son producidos en el metabolismo secundario y dentro de algunos presentan capacidad antioxidante. los compuestos antioxidantes son: los polifenoles, flavonoides, lignanos, estilbenos y taninos. Estos compuestos tienen la capacidad de eliminar ROS, por su participación como agentes reductores o donadores de hidrogeno, estas acciones favorecen un estado antioxidante y fortalecen el sistema de defensa antioxidante del organismo, resultando en una disminución del daño oxidativo (Charu & Prakash, 2015)

2.6 Producción de frijol en México y la vaina de frijol como residuo

Phaseolus vulgaris conocida comúnmente como frijol es una planta herbácea perteneciente a la familia de las fabaceae, posee tallos delgados como débiles y su fruto es una vaina curvada que abre espontáneamente cuando está madura dando una semilla oblonga, ovalada o redondeadas, según sea su variedad.

El frijol es originario de Mesoamérica y Sudamérica; sus numerosas variedades se cultivan en todo el mundo para el consumo, como sus vainas verdes, semillas frescas o secas.

México se posiciona en el cuarto lugar en la producción de frijol a nivel mundial con 1 274 .23 miles de toneladas y exporta grandes cantidades a estados unidos, Canadá y china. Se planea de acuerdo a los programas federales aumentar la cosecha del frijol hasta el año 2030 en diferentes regiones del país, lo cual implica aumentar la superficie de cultivo del frijol por ende la generación de residuos de la vaina de frijol será mayor de acuerdo a las toneladas generadas al año de frijol. Según la SAGARPA en 2008 se utilizó una superficie de 1.688.477 hectáreas por año. (SAGARPA, 2017)

2.7 Composición química y sus propiedades de la Vaina de frijol (*phaseoli pericarpium*)

La composición química de la vaina de frijol o pericarpio de frijol ha sido muy estudiada. Contiene derivados de guanidina, ácido indoleacético, triterpenos, ácidos orgánicos, aminoácidos, meso-inositol, ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos fosfórico y silícico, estigmasterina, β - y γ -sitosterol, sales de cromo (1ppm), sílice soluble, y vitaminas (C y E) (Labuda *et al.*, 2017).

Los diversos componentes de la vaina de frijol hacen de ella un subproducto susceptible de ser aprovechado con varios fines, entre los que se encuentran los terapéuticos en el tratamiento de varios padecimientos. La vaina de frijol, procedente de variedades de flores blancas y secado en condiciones naturales, en un lugar sombreado con circulación de aire, exhibe propiedades antidiabéticas y diuréticas.

Los antioxidantes de la dieta juegan un papel importante en la defensa frente al envejecimiento, a las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

2.8 Antecedentes de vaina de frijol (*Phaseoli pericarpium*)

Phaseoli pericarpium ha sido usada tradicionalmente como diurético y de manera débil la diabetes, como te de hierbas teniendo efecto saludable en la vejiga y el riñón, también para la artritis reumatoide.

En el siglo XX se han publicado artículos sobre los efectos benéficos de *Phaseoli pericarpium*, particularmente en 1923, en Canadá Betram Collip realizó un estudio sobre el efecto que el extracto etanólico de la vaina de frijol tuvo en la reducción de la glucosa en sangre en conejos. Años más tarde en 1937, De Lapp (Austria) afirmó que el té vaina del frijol reduce los niveles de glucosa en la sangre de personas sanas, pero no en los pacientes diabéticos. Durante este siglo se siguieron publicando, artículos o en libros de plantas medicinales, los efectos benéficos de *Phaseoli pericarpium*.

En los últimos 20 años se ha tratado de caracterizar la vaina de frijol. En Polonia se ha tenido gran interés en el estudio de *Phaseoli pericarpium* y se han reportado varios años en su farmacopea. En el año 2000, Lutomski & Hasik reportaron la amplia actividad en la disminución de enfermedades renales, uretrales y de vejiga. En el 2004 se realizó un análisis de los ácidos fenólicos presentes en la vaina de frijol por HPLC identificando, ácidos hidrogenbenzoicos, ácido vanílico y ácido- β -resorcílico. Dos años más tarde Cerovic *et al.* 2006 publica sobre la existencia de un efecto en la glicemia postprandial en la salud humana del extracto de la vaina de frijol.

Un año después, en 2007, Paplinski, realiza un análisis de los aminoácidos presentes en la vaina de frijol por HPLC. Dos años después, Jedrzejko *et al.* (2009) menciona el uso de la vaina de frijol como antiséptico y astringente de los compuestos provenientes de la vaina como: flavonoides, fenoles, alcaloides y taninos relacionados.

Varios años después Marzyski *et al.* (2015) presentó los excipientes y surfactantes adecuados para realizar un sólido oral del extracto de la vaina de frijol.

Posteriormente, Labuda (2017) cultivó varias especies de la vaina y caracterizó los compuestos fenólicos provenientes del extracto acuoso de estas.

2.9 Antecedentes de los estudios realizados en la Unidad Profesional Interdisciplinaria en Biotecnología

La Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), cuenta con el área experimental de Posgrado en Bioprocesos y particularmente en el laboratorio de Tecnología Ambiental, se han realizado estudios con residuos de la vaina de frijol provenientes del campo, a fin de encontrar un uso que contribuya a la valorización de este residuo.

En el año 2013, Trejo José Luis presentó la tesina sobre Caracterización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones de la vaina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su actividad biológica, donde encontró alcaloides flavonoides, azúcares reductores, quinonas y cumarinas y una actividad antioxidante de hasta el 93%.

En el año 2014, Cumbres-Piña, evaluó la capacidad hipolipemiante y dislipimiente del extracto acuoso de la vaina de frijol en ratones CD1, el cual presentó una actividad mínima reduciendo los niveles de glucosa y lípidos en sangre. Erika Olivo (2015) realizó el estudio fitoquímico de fracciones de dicho extracto frijol en el cual demostró la presencia de alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, cumarinas, taninos y saponinas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar los extractos obtenidos a partir de la vaina de frijol (*Phaseoli pericarpium*) y evaluar su actividad antioxidante.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos de *Phaseoli pericarpium* utilizando cuatro diferentes solventes: hexano, acetato de etilo, etanol y agua.
2. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los extractos obtenidos mediante los diferentes solventes.
3. Realizar un tamiz fitoquímico de los extractos de la vaina de frijol.
4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos, mediante los ensayos basados en la captación de radicales libres de DPPH⁺ (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt).

4. Justificación

El cuerpo humano tiene un sistema antioxidante natural que ayuda a la eliminación de radicales libres, pero bajo ciertas condiciones de estrés oxidativo requiere una fuente externa de alta capacidad antioxidante para el mantenimiento normal del organismo. Actualmente, es de gran interés la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos con actividad antioxidante, principalmente aquellos que son de origen vegetal.

La vaina de frijol ha sido estudiada por algunos grupos de trabajo y entre sus muchos componentes se encuentran algunos metabolitos secundarios que tienen capacidad antioxidante. Al ser un residuo sub-aprovechado de uno de los cultivos agrícolas más importantes y de mayor producción en México, la vaina de frijol es un recurso que puede obtenerse de manera económica y en grandes cantidades. Su aprovechamiento fitoterapéutico, basado en el conocimiento científico de sus propiedades biológicas, entre las que destaca la antioxidante, podría proponerse como alternativa natural para reducir el daño oxidativo provocado por los radicales libres en el organismo.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antioxidante de la vaina (flor de junio) de una de las variedades frijol cultivado en la región del campo de Villa Guerrero, en el Estado de México, para lo cual se obtuvieron los extractos hexánico, acético, etanólico y acuoso de la vaina seca,

5. Metodología

5.1. Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, se siguió la estrategia experimental mostrada en la figura 1

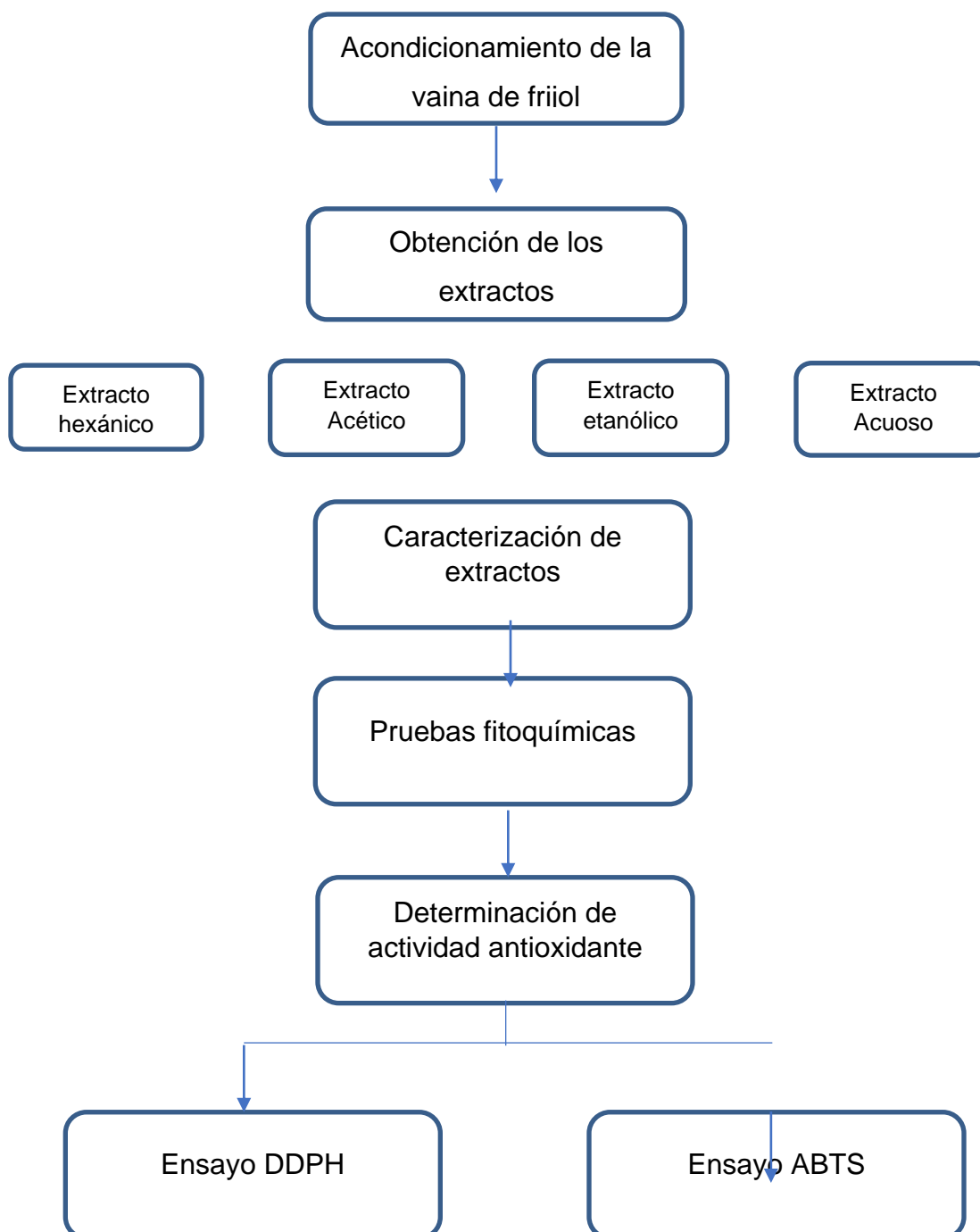


Figura 1. Estrategia experimental.

5.2. Acondicionamiento de la vaina de frijol

Primeramente, la vaina de frijol, proveniente del municipio de Villa Guerrero, del Estado de Morelos, se separó del tallo, se seleccionó y se retiró el exceso de tierra de la vaina con una serie de 2 a 3 lavados con agua potable (Figura 2). Posteriormente, se secó en un horno (Marca Rossie) de convección mecánica a



Figura 2. Separación, selección y lavado de vaina de frijol.

60°C, se trituroó con un molino y finalmente el polvo obtenido se almacenó a temperatura ambiente.

5.3. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos de vaina de frijol, se utilizó el sistema de extracción sólido-líquido Soxhlet con recirculación, empleando como solventes hexano, acetato de etilo, etanol y agua. La vaina de frijol molido se colocó en el sistema soxhlet, empaquetada previamente en cartuchos con un peso total

aproximado de 161.35 g y se hizo pasar 4 L del solvente correspondiente durante el tiempo requerido para cada uno; hasta la evaporación del solvente y condensación por 48 horas. Por último, los solventes obtenidos del sistema se concentraron por rotoevaporación mediante el equipo Hahnvapor a las condiciones de temperatura de ebullición (acorde al solvente) a 40-50 rpm hasta tener la menor cantidad de solvente en el extracto (Rivas et al.2016). La obtención del extracto acuoso se concentró por secado por aspersion con el equipo spray dryer marca Büchi modelo 290, posteriormente se realizaron los cálculos para conocer el rendimiento de cada extracto.



Figura 3. Montaje de sistema soxhlet y rotavapor hahnvapor

5.4 caracterización de los extractos

5.4.1. Determinación de pH

Se determinó el pH de los extractos utilizando el potenciómetro Thermo scientific Orion disolviendo una porción de los extractos en su solvente.

5.4.2. Determinación de sabor

Se tomó una porción del extracto, se probó y registro los sabores

5.4.3. Determinación de olor

Se tomó una porción del extracto sólido o viscoso y se determinó su olor correspondiente.

5.4.4. Determinación de color

Usando el equipo CR-10 (Color Reader) marca Konica Minolta se determinó el color de los diferentes extractos esparciendo el extracto en una superficie de vidrio y tomando lectura de los extractos de los diferentes parámetros del color L*, a* y b. Además, se utilizó un convertidor de coordenadas para conocer el color en el espacio de color.

5.4.5. Determinación de conductividad

Utilizando el equipo PC-700 Marca Oakion se determinó la conductividad de los extractos solubilizándolos en sus solventes con una concentración de 1.6 mg/mL

5.5. Fitoquímica de la vaina de frijol

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Phaseoli pericarpium* se detectaron mediante la realización de reacciones características, colorimétricas o de precipitación como: Dragendorff y Mayer (alcaloides), Shinoda (flavonoides), Liebermann-Burchard(esteroides), Börtranger (quinonas), gelatina (taninos), índice de espuma (saponinas), cloruro férrico (compuestos fenólicos). Además de pruebas cualitativas de Azúcares reductores, lípidos y proteínas.

5.7. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto

5.7.1. Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones madre con una concentración de 100 mg/mL de los extractos hexánico, acético, etílico y acuoso, posteriormente se hicieron soluciones de 25,15,10,5,1,0.5 mg/mL a partir de la solución madre con su respectivo solvente.

5.7.2. Ensayo DPPH

De acuerdo con el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), se preparó una solución metanólica del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) 0.1 mM, la cual absorbe a una longitud de onda de 517 nm. La actividad antioxidante, mediante esta metodología se determina por decrecimiento de la absorbancia después de entrar en contacto con las muestras.

Para cada ensayo se utilizaron 2.9 mL de la solución metanólica del radical DPPH y se agregaron 100 μ L del extracto a las diferentes concentraciones y las mezclas se mantuvieron en condiciones de oscuridad. Se obtuvo la absorbancia mediante el equipo espectrofotométrico marca Unico modelo 2800 después de 30 y 60 minutos de haber comenzado la reacción.

Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando como blanco metanol.

5.7.3. Ensayo ABTS

De acuerdo con la metodología descrita por Re *et al.* (1999), el radical ABTS⁺ se obtuvo mediante la reacción de dos soluciones, ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM). La reacción se incubó durante 16 h, en condiciones de oscuridad y una vez completado este último paso se diluyó en etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.1 a una longitud de onda de 734nm. Para cada ensayo se utilizaron 2 mL de ABTS⁺ a los cuales se agregaron 100 μ L de los extractos y se midió la absorbancia 6 minutos después del inicio de la reacción.

6. Resultados

6.1. Rendimiento

Se realizó la extracción de metabolitos secundarios de la vaina de frijol con diferentes solventes (hexano, acetato de etilo, etanol y agua). A partir de un lote con un peso de 161.65 g de vaina, se obtuvo un rendimiento para cada extracto (**Tabla 1**).

Tabla 1. Rendimiento de extractos

	Peso (g)	Rendimiento (%)
Extracto Hexánico	0.94	0.58
Extracto acético	2.32	1.43
Extracto Etílico	5.01	3.10
Extracto Acuoso	22.32	13.80

6.2. Caracterización del extracto

Los extractos obtenidos se refrigeraron a una temperatura de 4°C a 0°C y se realizaron las pruebas de pH, olor, sabor, color y conductividad obteniéndose los resultados presentados en la tabla 2

Tabla 2. Caracterización de extracto

	pH	Olor	Sabor	Color (L, A, B)			Conductividad (μ S)
Hexánico	1.93	Dulce- fragante	Umami	61.8,	+2.4,	+17.1	0
Acético	1.82	Refrescante	Amargo	29.9,	+1.4,	+6.1	0
Etílico	4.69	Resina	Agrio	31.4,	+1.6,	+7.0	71.4 \pm 1.22
Acuoso	4.83	Dulce	Agrio	62.3,	+5.9,	+25.5	452.6 \pm 0.57

6.3. Pruebas fitoquímicas

Se realizaron pruebas fitoquímicas cualitativas para la determinación de la presencia de los principales subgrupos de compuestos fenólicos que tienen capacidad antioxidante (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Los subgrupos que están presentes en los extractos son las flavonas, xantonas, cumarinas, quinonas y taninos. Además, se identificó, la presencia de azúcares, lípidos y proteínas.

Tabla 3. Fitoquímica de los extractos de vaina de frijol

	Hexánico	Acético	Etanólico	Acuoso
FLAVONOIDES				
Shinoda	-	+	-	-
	Xantonas y Flavonas		Xantonas y Flavonas	Xantonas y Flavonas
NaOH	+++	-	+++	+
CUMARINAS				
Erlich	-	-	+	+
NH ₄ OH	-	-	-	-
GLICOSIDOS CIANOGENICOS				
	-	-	-	-
SAPONINAS				
Espuma	-	-	-	+
Liebermann Bourchnard	esteroidales	-	-	-
Rosenthaler	-	-	-	-
SESQUITERPENLACTONAS				
	-	-	-	-
ALCALOIDES				
Dragendorff	-	-	-	-
Sonneschain	-	-	-	-
AZÚCARES REDUCTORES				
Fehling	-	+	+++	+++
Benedict	-	+	+++	+++
TANINOS				
Gelatina	-	-	-	-
Cloruro ferrico	-	+	-	-
Ferrocianro de potasio	-	-	-	-
QUINONAS				
NH ₄ OH	-	-	-	-
H ₂ SO ₄	-	+	+	-
Börntragner	-	-	-	-
LÍPIDOS				
	+++	-	-	-
PROTEÍNAS				
	+++	+++	-	-
GLUCÓSIDOS CARDIACOS				
Legal	-	-	+	-
Baljet	-	+	+	-

6.4. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo DDPH

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos por el ensayo DPPH, midiéndose la absorbancia a los 30 min y 60 min, posteriormente se calculó el % de inhibición. Además, se hizo una curva de comparación con ácido ascórbico (Figura 4 en Anexos) para presentar los resultados en términos sencillos VCEAC (Actividad antioxidante equivalente a vitamina C) como se muestra en la tabla 4,5,6 y 7. Se midió el tiempo con el objetivo de comprobar la influencia del tiempo y que el radical resultante sea estable (Sánchez *et al.*, 1997).

El extracto hexánico a los 60 min alcanzó un % de inhibición considerablemente alto con respecto al % de inhibición de 30 min en las concentraciones 0.5 y 1 mg/mL (superando el 300%). Sin embargo, para las concentraciones más altas no fue mayor al 20% y para la concentración de 25 mg/mL fue 23% mayor a la alcanzada en 30 min.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto hexánico.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%) (30 min)	VCEAC (μ M/mL)	Inhibición (%) (60 min)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	0.92 \pm 0.40	35.66 \pm 7.24	3.41 \pm 0.002	110.23 \pm 0.03
1	1.46 \pm 0.44	45.41 \pm 7.91	5.43 \pm 0.009	145.39 \pm 0.15
5	7.73 \pm 3.23	189.12 \pm 30.25	8.32 \pm 4.707	195.70 \pm 81.81
10	8.65 \pm 4.14	174.49 \pm 74.43	9.22 \pm 0.017	211.25 \pm 0.30
15	9.90 \pm 0.01	197.09 \pm 0.13	10.72 \pm 0.357	237.35 \pm 6.20
25	11.65 \pm 0.89	228.52 \pm 15.92	14.40 \pm 0.209	301.29 \pm 3.63

A los 60 min, el extracto acético presentó un porcentaje de inhibición 50% mayor al obtenido a los 30 min, para la concentración más baja. Las subsecuentes concentraciones no sobrepasaron el 50%. Sin embargo, se mantuvieron por arriba

del 20% de inhibición a los 30 min. A partir de la concentración 5mg/mL de extracto acético superó los porcentajes de inhibición del extracto hexánico.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acético.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%) (30 min)	VCEAC (μ M/mL)	Inhibición (%) (60 min)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	6.84 \pm 4.50	142.27 \pm 33.23	10.89 \pm 1.68	240.25 \pm 29.24
1	7.68 \pm 4.72	157.44 \pm 0.18	11.11 \pm 2.63	244.03 \pm 45.64
5	13.94 \pm 6.32	270.14 \pm 14.21	19.11 \pm 0.95	382.98 \pm 16.44
10	22.09 \pm 8.55	416.81 \pm 13.06	28.56 \pm 0.46	547.08 \pm 8.00
15	26.94 \pm 8.44	504.00 \pm 29.01	32.63 \pm 0.07	617.93 \pm 1.17
25	37.50 \pm 8.84	694.09 \pm 47.77	46.54 \pm 0.80	859.57 \pm 13.90

El extracto Etílico alcanzo para su concentración de 0.5mg/mL un % de inhibición a 60min mayor del 50% con respecto al % de inhibición a 30 min. La siguiente concentración alcanza un 25% más de inhibición y las siguientes concentraciones hasta la última no rebasan un 10% más de inhibición a 60 min

Tabla 5. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto etílico.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%) (30 min)	VCEAC (μ M/mL)	Inhibición (%) (60 min)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	2.31 \pm 3.09	60.73 \pm 55.67	5.46 \pm 0.73	151.03 \pm 13.14
1	5.47 \pm 0.86	117.59 \pm 15.46	6.85 \pm 0.48	176.12 \pm 8.69
5	30.90 \pm 0.37	575.36 \pm 6.68	33.01 \pm 3.18	647.02 \pm 57.31
10	53.99 \pm 2.19	990.86 \pm 38.65	58.22 \pm 5.07	1100.72 \pm 91.26
15	67.80 \pm 3.41	1239.43 \pm 61.35	74.15 \pm 0.66	1387.42 \pm 11.84
25	76.21 \pm 1.48	1390.83 \pm 26.67	78.38 \pm 0.55	1463.40 \pm 9.85

El extracto acuoso tuvo una actividad antioxidante similar. Para las concentraciones de 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, a los 60 min se alcanzó un nivel de inhibición 50% más alto con respecto al alcanzado a los 30 min. Las demás concentraciones no rebasaron un 10% más de inhibición a 60 min. Sin embargo, no tienen una alta capacidad antioxidante el extracto acético.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición DPPH y Capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acuoso

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%) (30 min)	VCEAC (μ M/mL)	Inhibición (%) (60 min)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	1.34 \pm 0.39	43.34 \pm 6.99	3.35 \pm 0.31	109.33 \pm 5.37
1	1.58 \pm 0.91	47.63 \pm 16.31	4.50 \pm 1.30	129.23 \pm 22.60
5	6.19 \pm 0.003	130.62 \pm 0.05	14.31 \pm 9.28	299.85 \pm 161.22
10	11.83 \pm 15.67	232.14 \pm 282.03	28.59 \pm 8.61	547.97 \pm 149.61
15	32.72 \pm 0.18	608.08 \pm 3.26	35.87 \pm 3.56	674.51 \pm 61.90
25	49.12 \pm 0.54	903.30 \pm 9.79	40.45 \pm 1.81	754.14 \pm 31.44

De manera general, la diferencia del valor del nivel de inhibición en los tiempos de 30 a 60 min, se va reduciendo conforme aumenta la concentración de extracto, en algunos casos de manera significativa.

De todos los extractos evaluados mediante esta metodología, el hexánico fue el que presentó los menores porcentajes de inhibición. Los extractos acético y acuoso tuvieron valores muy similares en sus porcentajes de inhibición y presentaron mayores porcentajes de inhibición que el hexánico. Por último, los mayores porcentajes de inhibición fueron alcanzados por el extracto etílico.

6.5. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo ABTS

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos por el método ABTS obteniéndose los resultados mostrados en las tablas 8,9,10,11. Al igual que el método DPPH se hizo una curva de comparación con Ácido ascórbico para presentar los resultados en términos sencillos VCEAC.

El extracto hexánico alcanzó un porcentaje de inhibición del 66% a la concentración de 25mg/mL (Tabla 8). Sin embargo, hay una tendencia a la saturación, pues conforme aumenta la cantidad de extracto, se mantiene la misma cantidad de reactivo.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto hexánico

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	12.94 \pm 2.15	75.80 \pm 11.7
1	18.33 \pm 5.38	105.25 \pm 28.8
5	35.97 \pm 8.63	201.65 \pm 47.1
10	47.26 \pm 4.65	263.32 \pm 25.4
15	53.11 \pm 6.33	295.28 \pm 34.6
25	66.28 \pm 9.78	367.27 \pm 53.4

El extracto acético alcanzó el mayor porcentaje de inhibición en la concentración de 10 mg/ml y de manera parecida tiene una tendencia a la saturación, a partir de su punto máximo (Tabla 9). Sin embargo, las dos primeras concentraciones son muy parecidas al extracto hexánico difiriendo en la tercera concentración, aproximadamente, doblando un porcentaje de inhibición.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acético

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	11.68 \pm 0.40	68.88 \pm 2.2
1	20.88 \pm 0.91	119.19 \pm 5.0
5	60.49 \pm 0.78	335.64 \pm 4.3
10	69.91 \pm 1.41	387.09 \pm 7.7
15	60.55 \pm 1.29	335.93 \pm 7.1
25	46.55 \pm 7.32	259.46 \pm 40.0

El extracto etílico logró su porcentaje de inhibición significativo a la concentración 5 mg/mL (Tabla 10). Sin embargo, su capacidad antioxidante representa el doble de la presentada por el extracto acético y el triple del hexánico, en las concentraciones de mayor % de inhibición.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto etílico.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	8.82 \pm 6.90	74.90 \pm 5.2
1	20.37 \pm 4.62	116.37 \pm 25.2
5	95.54 \pm 1.81	527.12 \pm 9.9
10	96.15 \pm 1.86	530.48 \pm 10.2
15	98.88 \pm 0.63	545.42 \pm 3.5
25	97.15 \pm 0.77	535.96 \pm 4.2

El extracto acuoso llegó a su mayor porcentaje de inhibición en la concentración de 10 mg/mL, pero fue un poco menor a la que presentó el extracto etílico y mayor a los otros dos extractos (Tabla 11).

Tabla 10. Porcentaje de inhibición ABTS y capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (VCEAC) del extracto acuoso.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	VCEAC (μ M/mL)
0.5	17.34 \pm 5.55	99.82 \pm 30.32
1	19.63 \pm 3.74	112.32 \pm 20.44
5	74.68 \pm 7.42	413.16 \pm 40.55
10	88.51 \pm 7.51	488.73 \pm 41.01
15	81.73 \pm 0.79	451.67 \pm 4.32
25	78.09 \pm 16.02	431.76 \pm 87.52

6.6. Determinación de la IC₅₀ del ensayo DPPH y ABTS

Se determinó el IC₅₀ (es el valor de la concentración que una muestra requiere para inhibir el 50% del radical), mediante la relación de las concentraciones utilizadas y los porcentajes de inhibición obtenidos. Para algunos extractos no se pudo determinar este parámetro. Los resultados de ambos ensayos se presentan en la tabla 12. Un IC₅₀ bajo significa que el extracto analizado tiene una mejor capacidad antioxidante.

Tabla 11. IC_{50} de los extractos de la vaina de frijol por el método DPPH y ABTS.

Extracto	IC_{50} DPPH	IC_{50} DPPH	IC_{50} DPPH	IC_{50} DPPH	IC_{50}	IC_{50} ABTS
	30 min (mg/mL)	30 min VCEAC (μ M/mL)	60 min (mg/mL)	60 min VCEAC (μ M /mL)	ABTS (mg/mL)	VCEAC (μ M /mL)
Hexánico	ND	ND	ND	ND	13.3	278.28
Acético	ND	ND	ND	ND	3.97	277.89
Etilico	10.16	919.06	9.24	842.62	2.6	283.38
Acuoso	ND	ND	ND	ND	3.13	277.57

7. Discusión

7.1. Extracción

En la extracción de los metabolitos secundarios se obtuvo mayor rendimiento en el extracto acuoso, esto evidencia que la vaina de frijol contiene compuestos polares en mayor proporción.

7.2. Caracterización y fitoquímica

Los extractos hexánico y acético, obtenidos por solventes no polares o poco polares, presentan un pH correspondiente a un ácido fuerte con valores por debajo de pH 2. Por otra parte, los extractos más polares tienen un pH correspondiente a un ácido débil con valores de aproximadamente pH 4.8.

Los diferentes extractos de la vaina de frijol mostraron diferentes colores, de acuerdo con los valores de L, a, b de la escala de medida. Los extractos más parecidos en cuanto al color que presentaron fueron el etílico y acético, con un color gris claro y oscuro. También existe una similitud entre el color del extracto hexánico y acuoso, con una tonalidad café oscuro y café canela.

Los valores de conductividad de los extractos van desde 0 hasta 452 μS (Tabla 2), presentando una conductividad nula, los extractos obtenidos con solventes menos polares (extracto hexánico y acético). Mientras que los extractos obtenidos con solventes más polares se puede notar alguna lectura de conductividad, siendo el extracto acuoso el que tiene una mayor conductividad.

De acuerdo con el tamiz fitoquímico realizado a los extractos de *Phaseoli pericarpium*, estos contienen compuestos fenólicos (flavonoides principalmente), cumarinas, quinonas y taninos, por lo que todos los extractos poseen de capacidad antioxidante. Cada extracto puede contener la presencia de flavonoides o compuestos fenólicos, pero puede variar el compuesto o la cantidad debido a la diferente solubilidad que presentan en diferentes solventes polares. La glicosilación de sus grupos hidroxilos, los hace más polares y solubles en agua.

Sin embargo, la ausencia de la glicosilación y la presencia de varios grupos hidroxilo (OH) hace variar la polaridad de los compuestos fenólicos (Cartaya & Reynaldo, 2001).

7.3. Capacidad antioxidante extractos

El porcentaje de inhibición, determinada por la técnica DPPH, en los extractos hexánico, acético, etílico y acuoso se incrementó al aumentar la concentración de los extractos. Los extractos no alcanzan el nivel de inhibición necesario para calcular la IC_{50} durante 30 y 60 min, exceptuando el extracto etílico, el cual alcanzó el 76% y 78% de inhibición, respectivamente. Calculando la IC_{50} para el dicho extracto a los dos tiempos evaluados, se obtuvieron valores de 10.16 mg/mL y 9.24 mg/mL, respectivamente.

La variación de la capacidad antioxidante determinada a 30 min y a 60 min puede deberse a la propia naturaleza de los compuestos fenólicos, sus diferentes estructuras fenólicas que presentan su energía de disociación unida a OH, deslocalización por resonancia del OH, el impedimento estérico, por su polaridad y su capacidad de los compuestos fenólicos a unirse al centro del radical DPPH. De acuerdo con estas características se forman reacciones principales de antioxidantes con el DPPH y posteriormente unas reacciones secundarias que son residuales (Sánchez *et al*, 1997).

La capacidad antioxidante del extracto hexánico es baja con respecto a los demás extractos debido a la presencia de lípidos existente en él. Por lo general, los lípidos se autooxidan formando radicales libres. Estos lípidos reaccionan con los compuestos fenólicos provenientes de la extracción inhibiendo los lípidos y eliminando los radicales hidroxilo y superóxido (Kenner *et al.*, 1994).

La capacidad antioxidante del extracto acuoso se afectó por la naturaleza del ensayo, pues se esperaba una buena capacidad antioxidante con el ensayo DPPH por la presencia compuestos fenólicos (flavonoides y cumarinas). Sin embargo, el

DPPH solo es soluble en medios orgánicos y no en medio acuoso, lo que es una limitación importante a la hora de interpretar antioxidantes hidrofílicos (Arnao, 2000).

Los extractos acético y etílico presentaron mayores porcentajes de inhibición por la presencia de variados compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, quinonas e inclusive taninos). Además, son compuestos orgánicos los cuales permiten una buena interacción con el compuesto DPPH, pero el extracto acético no alcanzó el 50% de inhibición por lo cual no se puede determinar la IC₅₀.

El porcentaje de inhibición de todos los extractos de la vaina de frijol, determinado por el método ABTS, presentó valores por arriba del 50% de inhibición y fue posible determinar la IC₅₀. Los mayores porcentajes de inhibición fueron alcanzados por el extracto etílico, seguido por el acuoso, acético y por último el hexánico. La metodología ABTS por lo general tiene valores de inhibición mayores a comparación de la metodología DPPH (Pérez & Saura , 2008).

Los valores obtenidos para estos extractos, mediante el ensayo del radical ABTS, se lograron debido a que el radical se puede solubilizar en solvente acuoso y en solventes orgánicos, esta característica le permite medir muestras con naturaleza hidrofílica y lipofílica. Además, que tiene una baja selectividad, reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado independientemente de su capacidad antioxidante real (Arnao, 2000; Palomino, 2009).

El cálculo de la IC₅₀ para todos los extractos permite comparar de manera rápida la capacidad antioxidante de los extractos de la vaina de frijol. Además de hacer una comparación entre los métodos DPPH y ABTS. La IC₅₀ del extracto etanólico en la prueba ABTS es por lo menos 3 veces menor a la obtenida en la prueba DPPH.

De acuerdo con Sánchez *et al.* (1997), el ABTS y DPPH tienen la misma estequiometría con los estándares Trolox y L-ácido ascórbico. Así, la diferencia de valores de IC₅₀ del ensayo ABTS no debería ser mayor a 40%. Sin embargo, la presencia de compuestos coloridos en las muestras, la solubilidad de las muestras

en la solución de radicales, los compuestos implicados no coloridos y el tiempo de reacción afectan el porcentaje de inhibición del radical y a su vez este afecta al valor de la IC_{50} .

8. Conclusiones

La utilización de los solventes hexano, acetato de etilo, alcohol etílico y agua con diferentes polaridades, permitió extraer diferentes metabolitos de *Phaseoli pericarpium*. Por otro lado, comenzando por el solvente menos al más polar, se obtuvieron rendimientos acordes al incremento de la polaridad.

Los extractos de *Phaseoli pericarpium* obtenidos por solventes con nula o poca polaridad presentaron características similares, una acidez correspondiente a ácidos fuertes y una conductividad eléctrica nula. También los extractos obtenidos con solventes más polares presentaron similitudes, un pH correspondiente a ácidos fuertes, sabor agrio y conductividad eléctrica. Además de presentar otras similitudes entre sí como los colores.

Los compuestos fenólicos que se determinaron por el tamiz fitoquímico en los extractos de *Phaseoli pericarpium* son los flavonoides, cumarinas, quinonas y taninos. Los principales compuestos fenólicos presentes en todos los extractos son los flavonoides y los de menor presencia son los taninos, los cuales solo están presentes en el extracto acético.

El tiempo que se requiere para determinar la capacidad antioxidante por la metodología DPPH de los extractos es de 60 min, teniendo resultados significativos en las concentraciones más bajas.

La mejor metodología usada, para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de la vaina de frijol es la que emplea el radical DPPH. Sin embargo, los ensayos de DPPH y ABTS se pueden emplear indistintamente para determinar la capacidad antioxidante del extracto etílico.

9.Referencias

- Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals:a practical case. *Trend in food science & technology*, 11(11), 419-421.
- Bagchi, K., & Puri, S. (s.f.). Free radicals and antioxidants in health and disease:a reiew. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 4(2), 350-360.
- Cartaya , O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides:Cartacterísticas químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Cerovic , A., Miletic, I., Konic-Ristic, A., Baralie, I., Djord, B., Djuricic, I., y otros. (2006). The dry pant extract of common bean seed does not have and effect on postpranglandial glycemia in healthy human subject. *Basic Med Sci*, 6(3), 28-33.
- Charu, G., & Prakash, D. (2015). Phytofarmaceuticals and their health benefits. *Dream* 47, 17(6), 22,28-30.
- Coronado, H. M., Vega y Leon, S., Gutierrez, T. R., Vazquez, F. M., & Radilla, V. C. (2015). Antioxidantes:perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42, 206-212.
- Jedrzejko, K., Kozlowski, M., & Manlara, M. (2009). Rosliny zrodlem leku laryngologicznego. *Med slles*, 63(3), 7-32.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German , B., & Kinsella, J. (1994). Natural antioxidant in grapes and wines. *J Agric Food Chem* , 42(1), 64-69.
- kuskoski , M. E., Asuero, G. A., Troncoso, M. A., Mancini Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia de Tecnologia Alimentaria*, 726-728.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., García Parrilla , M. C., & Fett, R. (2003). Actividad antioxidante de pigmentos antiocianicos. *Revista Bras de ciencia y tecnología*, 24(4), 691-693.
- Labuda, H., & Paplinski, R. (2004). Analysis of free phenolic acid in the pericarp of bea. *Ejpav*, 7(2), 1-9.
- Labuda, H., Buczkowska, H., Paplinski, R., & Najda, A. (2017). Secondary metabolites of pericarpium. *Acta Sci.Pol.hortorum cultus*, 6, 187-200.
- Lutomski , J., & Haisik, J. (2000). Fitoterapia w urologi. *Post fitoter*, 4, 8-12.
- Marzynki, Z., Kowalxckiewicz, K., & Bodek, K. H. (2015). Selecte excipientes and surfactant in oral solid dosage form with extract of phaseoli pericarpium. *Herba pol*, 61(4), 78-82.

- Palomino G., R., García P., C. M., Gil G., J. H., & Benjamin A., J. H. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de antioquia. *Revista de la facultad de química farmacéutica.*, 16(3), 388-393.
- Papilinski, R. (2007). Analysis of free amino acid in the pericarp with HPLC. *method herba pol.*, 53(3), 308-312.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Molliendo, P., & Villa, B. J. (2014). Componentes fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista de Química*, 68-81.
- Perez Rubio, K. G., & Hernandez Chavez, A. (2014). *Fitofarmacología. In farmacología general una guía de estudio.* (J. de Leon Fraga, Ed.) Mexico: McGrawHill.
- Pérez J., J., & Saura C., F. (2008). Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of results. *International journal of food science and technology*, 43, 185-191.
- Pérez Najera, V. C., Lugo Cervantes, E. C., Gutiérrez Lomelí, M., & Del Toro Sanchez, C. L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cascara de lima y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de ciencias biológicas de la salud*, 15(3), 10-22.
- Quintanar, M., & Calderon, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Educación Bloquímica*, 28(3), 89-101.
- RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Panala, A., Yang, M., & Rice Evans, C. (1999). antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Radic. Biol, Med*, 26(9), 1231-1237.
- Rivas, M. C., Oranday, C. M., & Verde, S. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *Omniascience*, 6-8.
- SAGARPA. (s.f.). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. 1-9.
- San Miguel Hernández, Á., & Martín Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Actualizaciones en el laboratorio clínico*, 106-113.
- Sanchez Moreno, C., Larrauri, J. A., & Calixto, F. S. (1997). A procedure to measure the antioxidant efficiency of polyphenol. *Journal of the science of food and agriculture*, 76(2), 270-278.
- WHO. (2005). *National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines.* Switzerland: Switzerland report.