

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS TECNOLOGÍA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA EN DOS ESPECIES DE FRIJOL : FRIJOL PALO (*Cajanus cajan* L.) Y FRIJOL CHAUCHA (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

QUINTANILLA ALCA, JOSEFA ROSARIO

PROMOCIÓN 2007 - II

Tingo María - Perú

2011



Q04

Q7

Quintanilla Alca, Josefa Rosario

Evaluación de la Actividad Antioxidante y Cuantificación de Quercetina en Dos Especies de Frijol: Frijol Palo (*Cajanus cajan* L.) y Frijol Chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.)

62 h.; 16 cuadros; 18 fgrs.; 61 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

**1. CAJANUS CAJÁN L. 2. PHASEOLUS VULGARIS L. 3. CUANTIFICACIÓN
4. POLIFENOLES 5. QUERCETINA 6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 7. PERÚ.**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 09 de Noviembre de 2011, a horas 05:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **QUINTANILLA ALCA, Josefa Rosario**, titulada:

“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACION DE QUERCETINA EN DOS ESPECIES DE FRIJOL DE LA ZONA: FRIJOL DE PALO (*Cajanus cajan* L.) Y FRIJOL CHAUCHA (*Phaseolus vulgaris* L.)

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **BUENO** en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 10 de Noviembre de 2011

M.Sc. **Gunter Daza Rengifo**
Presidente

Ing. **Lauriano Zavaleta de La Cruz**
Miembro

Ing. **José Blas Matienzo**
Miembro

Dra. **Elizabeth Ordoñez Gómez**
Asesora

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, guiar mis pasos, brindarme salud y fuerza.

A mi esposo, Miguel Herazo Q. con inmenso amor y profunda gratitud por su paciencia, sacrificio, confianza y apoyo.

A mis hijos, Sebastián y Andrea, por los momentos sacrificados, los amo infinitamente.

A mi padre, Andrés Quintanilla por inculcarme valores e incentivar me a ser profesional y a la memoria de mi Madre Julia Alca.

A mis hermanos, Marco, Miriam, Omar y Orlando por el apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, mi alma mater por acogerme en sus aulas y permitir realizarme como profesional.
- Al Ph.D. Manuel Sandoval Chacón. por guiarme en el desarrollo del presente trabajo de investigación, por su gran gentileza de impartir sus conocimientos constantemente y sobre todo por la confianza que depositó en mí.
- A la Doctora Elizabeth Ordóñez G. y al Ingeniero Jhony Vargas S. por su valiosa colaboración en el asesoramiento que hizo posible la culminación del presente trabajo.
- A los docentes de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por todos los conocimientos que me brindaron y quienes contribuyeron en mi formación profesional.
- A mi querido suegro J. Francisco Herazo D. por su gran esfuerzo en hacer que mis dificultades no obstaculicen mis metas y a mi suegra quien en vida me brindó cariño y sus sabios consejos.
- A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la culminación del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades del frijol	3
2.1.1. Aspectos generales.....	3
2.1.2. Aspectos botánicos	4
2.1.3. Frijol de palo (<i>Cajanus cajan</i> L.)	6
2.1.4. Frijol chaucha (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	7
2.2. Las leguminosas en la nutrición humana.....	8
2.2.1. Composición nutritiva.....	8
2.2.2. Factores antinutricionales	10
2.3. Generalidades de los polifenoles.....	11
2.3.1. Características de los flavonoides	12
2.3.2. Quercetina	13
2.3.3. Propiedades físicas y químicas de la quercetina	14
2.4. Aspectos generales de la actividad antioxidante y radical libre	15
2.4.1. Antioxidantes	15
2.4.2. Radicales libres.....	16
2.4.3. Química del radical libre.....	17
2.4.4. Especies reactivas del oxígeno (ERO).....	18
2.4.5. Radicales sintéticos	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Materia prima.....	21
3.3. Materiales y equipos de laboratorio.....	21
3.3.1. Materiales de Laboratorio	21
3.3.2. Equipos de laboratorio	22
3.3.3. Reactivos y soluciones.....	22
3.4. Métodos de análisis.....	23
3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales	23
3.4.2. Cuantificación de quercetina.....	23
3.4.3. Radical DPPH (2,2-diphenyl-picrilhydrazyl)	23
3.4.4. Radical peroxilo (ABTS).....	24
3.5. Metodología experimental	24
3.5.1. Preparación de las muestras	24
3.5.2. Preparación de los extractos.....	25
3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales de dos especies de frijol.....	26
3.5.4. Cuantificación de quercetina en dos especies de frijol.....	28
3.5.5. Evaluación de la capacidad antioxidante en dos especies de frijoles.....	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Cuantificación de polifenoles totales en la cáscara y cotiledón de dos especies de frijoles	35
4.2. Cuantificación de quercetina en dos especies de frijol.....	38
4.2.1. Determinación de la curva estándar	38

4.2.2. Cuantificación de quercetina.....	40
4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en dos especies de frijol	43
4.3.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH.....	43
4.3.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo	45
V. CONCLUSIONES.....	49
VI. RECOMENDACIONES.....	50
VII. ABSTRACT	51
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	53
IX. ANEXOS.....	62
X. GLOSARIO.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química del frijol.	9
2. Preparación de la curva estándar de polifenoles totales.	27
3. Preparación de concentraciones para la cuantificación de polifenoles totales.	28
4. Preparación de la curva estándar de quercetina.	30
5. Contenido de polifenoles totales en la cáscara y cotiledón de dos especies de frijol.	36
6. Concentraciones de quercetina para la curva estándar.	39
7. Contenido de quercetina en dos especies de frijol.	41
8. Comparación del coeficiente de Inhibición IC ₅₀ (DPPH) en dos especies de frijol.	44
9. Resultados del coeficiente de Inhibición IC ₅₀ (radical peroxilo) en dos especies de frijol.	46
10. Resultados de la curva estándar de polifenoles totales.	63
11. Análisis de variancia del contenido de polifenoles totales en cáscara y cotiledón de dos especies de frijol.	64
12. Análisis de variancia para el contenido de quercetina.	64
13. Preparación de soluciones intermedias para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de frijol por radical DPPH.	65
14. Análisis de varianza del extracto etanólico de las especies de frijol y partes del grano frente al radical DPPH.	65

15. Preparación de soluciones intermedias para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de frijol por el radical peroxilo.....	66
16. Análisis de varianza del extracto etanólico de las especies de frijol y partes del grano frente al radical peroxilo.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Planta común del género <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	3
2. Estructura anatómica del frijol.	4
3. Vainas y granos de frijol de palo <i>Cajanus cajan</i> L.	6
4. Vainas y granos de frijol chaucha <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	8
5. Estructura básica de los flavonoides.	13
6. Estructura molecular de la quercetina.	15
7. Reacción del radical DPPH con un antioxidante.	19
8. Flujograma de operaciones para la obtención de muestras.	25
9. Secuencia de operaciones en la preparación de extracto etanólico.	26
10. Flujograma de preparación de muestra para la cuantificación de quercetina.	29
11. Secuencia para la cuantificación de quercetina.	31
12. Diseño experimental para cuantificación de polifenoles totales y coeficiente de Inhibición IC ₅₀ del radical DPPH y peroxilo.	34
13. Comparación del contenido de polifenoles totales entre los tratamientos.	36
14. Curva estándar de quercetina.	39
15. Comparación del contenido de quercetina entre los tratamientos.	41
16. Comparación entre la eficiencia de los tratamientos frente al radical DPPH.	44
17. Comparación del coeficiente de inhibición IC ₅₀ del radical peroxilo.	46
18. Curva estándar para la cuantificación de polifenoles totales.	63

RESUMEN

Los frijoles son fuentes de fibra y proteínas, sin embargo su potencial nutracéutico llama mucho la atención en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas debido a que son valorados como fuentes de metabolitos secundarios, el efecto protector de los frijoles están asociados al contenido de compuestos tal como fitoalexinas entre ellos la quercetina el cual según estudios muestra propiedades antimutagénicas y previene la formación de radicales libres que eventualmente deterioran las moléculas biológicas. La zona de selva alta de la región Amazónica de Perú especialmente Tingo María tiene áreas extensas con tierras poco utilizadas donde los frijoles nativos crecen para buenos propósitos, sin embargo, su valor biológico no fue muy investigado. El objetivo de este estudio fue cuantificar el contenido de polifenoles y quercetina y evaluar la actividad antioxidante en dos especies nativas *Cajanus cajan* L. (frijol palo) y *Phaseolus vulgaris* L. (chaucha) que forman parte de la dieta alimenticia de los lugareños. La investigación se realizó en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicada en el distrito de Rupa-Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco de Perú. La cuantificación de polifenoles fue realizado por el método de Folin-Ciocalteu, el contenido de quercetina se determinó por el método descrito por TOKUSOGLU *et al.*, 2003, la actividad antioxidante fue establecido por inhibición de DPPH descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995 y los radicales peroxilo por el método ABTS. Los análisis fueron realizados

usando un espectrofotómetro Genesys 6 UV. El análisis estadístico fue realizado usando el diseño completo al azar (DCA) y el post análisis fue realizado si $p < 0,05$ usando prueba Tuckey (InStat Graphic). Los resultados del contenido de polifenoles (GAE mg/100g) fueron: cáscara de chaucha $2747,8 \pm 52,84$, cáscara de frijol palo $54,725 \pm 0,18$, el cotiledón de chaucha $24,176 \pm 0,74$, cotiledón de frijol palo $38,492 \pm 0,50$. La concentración de quercetina (mg/mL) fue: cáscara de frijol chaucha $159,67 \pm 9,0$, cáscara de frijol palo $4,291 \pm 0,34$, el cotiledón de frijol chaucha $2,711 \pm 0,21$ y el cotiledón de frijol palo $2,087 \pm 0,15$. El IC_{50} (mg/mL) para inhibición de DPPH fue: cáscara de frijol chaucha $0,032$, cáscara de frijol palo $6,28 \pm 0,1$, cotiledón de frijol chaucha $20,64 \pm 0,14$ y cotiledón de frijol palo $21,63 \pm 0,26$ respectivamente. El IC_{50} (mg/mL) para inhibición de peroxilo fue: cáscara de frijol chaucha $0,0078$, cáscara de frijol palo $0,891 \pm 0,1$, el cotiledón de frijol chaucha $1,890 \pm 0,02$ y cotiledón de frijol palo $1,642 \pm 0,02$ respectivamente.

PALABRAS CLAVES: *Cajanus cajan* L., *Phaseolus vulgaris* L., cuantificación, polifenoles, quercetina, actividad antioxidante, Perú.

I. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas de mayor consumo a nivel mundial son los frijoles comunes, como el *Phaseolus vulgaris* L. existiendo muchas otras especies con cualidades características para su consumo, por ejemplo en la zona tropical es muy apreciado el *Cajanus cajan* L. por su valor nutricional, disponibilidad y por su relativo bajo costo, la Amazonia peruana es un provisor de recursos naturales de mucha importancia por su gran biodiversidad. Los frijoles son reconocidos como fuente de proteínas, carbohidratos y minerales, además de compuestos polifenólicos que tienen un efecto protector contra enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer, arterosclerosis, diabetes, entre otros y aportan nutrientes básicos para el correcto funcionamiento del organismo vivo.

Recientemente se ha incrementado el interés en el estudio de los compuestos fitoquímicos de las semillas y cáscara de las diversas plantas comestibles tales como el frijol, debido según (BOATENG, 2007) a la importancia de la actividad biológica de compuestos polifenólicos que son benéficos para la salud tal como catequinas, antocianinas, y quercetina, la proteína y ácido fítico tienen también efectos antimutagénico anticarcinogénicos y antioxidante (son capaces de neutralizar a los radicales libres que producen daños a las membranas). La quercetina es un metabolito secundario, que corresponde al grupo de compuestos químicos denominados

flavonoides, clasificado en la subclase: flavonol, que junto a la vitamina C tiene efectos sinérgicos para cumplir con sus funciones antioxidativas, también la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E y disminuye la peroxidación de lípidos en la membrana. En base a este marco se planteó los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles y quercetina, en dos especies de frijol: palo (*Cajanus cajan* L.) y frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.) y en dos partes del grano: cáscara y cotiledón.
- Evaluar la actividad antioxidante frente al radical DPPH y radical peroxilo en las dos especies de frijol y dos partes del grano cáscara y cotiledón.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del frijol

2.1.1. Aspectos generales

El frijol es de origen americano, en la época precolombina se cultivaba en sus muchas formas, desde lo que hoy es Canadá hasta Chile, (CASSERES, 1970). Fue llevado a Europa después del descubrimiento de América y su cultivo se extendió por los diversos países del mundo donde encontró condiciones de clima apropiados formando variedades adaptables a los diversos ambientes, teniendo amplia difusión en todos los países con clima templado (CHIAPPE, 1970).



Figura 1. Planta común del género *Phaseolus vulgaris* L.

Existe aproximadamente 13,000 especies de leguminosas, pero menos de 20 son utilizadas como alimento (BRUNO, 1990) así, el principal componente de la dieta alimenticia especialmente en Latinoamérica es el

Phaseolus vulgaris L., éste género incluye a todas las especies de leguminosas más conocido como frijol común (OCHO-ANIN *et al.*, 2010).

2.1.2. Aspectos botánicos

2.1.2.1. Morfología

El género *Phaseolus* comprende unas sesenta especies, pertenecientes a los países cálidos, sus tallos son delgados de mayor o menor altura según que se trate de variedades de enrame o enanas, (CUBERO y MORENO, 1983).

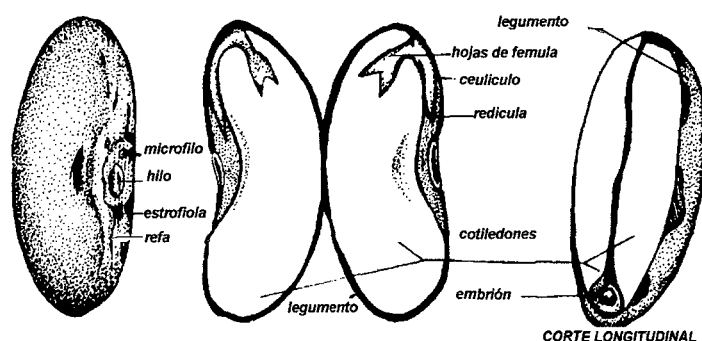


Figura 2. Estructura anatómica del frijol.

Las hojas son compuestas de tres folíolas enteras, las flores son de diverso color, papilionáceas y con pétalos desiguales, estandarte orbicular, alas obovales, a veces ablongas, quilla lineal dispuesta en espiral o en espolón, las flores se reúnen en racimos sencillos, insertos en la axila de las hojas. El fruto es una legumbre de forma variabilísima, recta o curva con borde redondeado o comprimido y las semillas son generalmente arriñonadas, provistas de dos cotiledones gruesos (Figura 2), (TAMARO, 1981).

2.1.2.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica para el *Phaseolus vulgaris* L. variedad chaucha según (CASSERES, 1970) es la siguiente:

- División: *Fanerógamas*
- Subdivisión: *Angiospermas*
- Clase: *Dicotiledones*
- Orden: *Rosales*
- Familia: *Leguminosae*
- Subfamilia: *Papilionordeas*
- Tribu: *Faseolas*
- Género: *Phaseolus*
- Especie: *vulgaris*
- Nombre común: *frijol, habichuela, judía común.*

Asimismo (CEDANO, 2006) describe la clasificación taxonómica para *Cajanus cajan* L. frijol de palo, de la siguiente manera:

- Clase: *Angiosperma*
- Subclase: *Dicotyledoneae*
- Orden: *Leguminosae*
- Familia: *Papilionaceae*
- Género: *Cajanus*
- Especie: *Cajan L.*

2.1.3. Frijol de palo (*Cajanus cajan* L.)

Esta planta según (CEDANO, 2006) es una leguminosa arbustiva de crecimiento determinado y/o indeterminado, de ciclo perenne, posee hojas alternadas trifolioladas distribuidas en forma espiral a lo largo del tallo, miden por lo general de 1 a 4 m de altura, poseen un follaje verde amarillento a verde púrpura, fuera de la época de producción son arboles leñosos y crece sobre un amplio rango de suelos bien agotados de playa a arcillas y materiales metamórficos y en zonas húmedas con buen drenaje, en el Perú puede cultivarse desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm de altitud (OLIDEN, 1995).



Figura 3. Vainas y granos de frijol de palo *Cajanus cajan* L.

El fruto es una legumbre o vaina que tiene de 2-9 semillas, su forma es lineal-oblonga con los extremos agudos u obtusos, posee dos valvas comprimidas con depresiones ligeras más o menos septada entre semillas. Las semillas tienen forma arrañonada o redondeadas pueden ser blancas, marrones, tintos o grises, las raíces producen nódulos similares al cowpea o

anconí del grupo de los *Rhizobium* y su tamaño varía de 0,2 a 2 cm (CEDANO, 2006).

Son una fuente excelente de proteína, las semillas son consumidas como verduras; los constituyentes químicos investigados indican que las hojas del frijol de palo son ricos en flavonoides y estilbenos, los cuales son considerados responsables de las eficacias benéficas en la salud humana, (WU *et al.*, 2009). El rendimiento según reporte de (OLIDEN, 1995) es de 1,244 a 1,662 TM/Ha, el peso de 1000 granos es de 80,7 a 91,3g.

2.1.4. Frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.)

Es de crecimiento arbustivo determinado de 40-45 cm, flor blanca a lila, vainas de color verde con estrías moradas y granos de color rojo con jaspe cremas. El inicio de la floración es a los 45 días de la siembra, la maduración uniforme a partir de los 100 días de la siembra. Amplia adaptación desde 100 hasta 2500 msnm, razonablemente tolerante a la acidez del suelo con pH 5,5 – 6,5; en el valle interandino la siembra puede ser todo el año, según lo señala (MANDUJANO, 2008).

Se diferencian tres partes en el frijol común: la cáscara de la semilla, el cotiledón y corte embriónico. La parte más importante en términos de peso es el cotiledón porque contiene proteínas y carbohidratos, mientras que la cáscara de la semilla contiene elevadas concentraciones de compuestos fenólicos estos últimos asociados a la prevención de enfermedades crónicas, (ROCHA-GUZMAN *et al.*, 2007) en la Figura 4, se presenta las vainas y granos de frijol chaucha.

Según el Proyecto PARA (2003) citado por (MANDUJANO, 2008), el rendimiento es de 2,000 a 4,000 kg/Ha, el peso de 100 granos es de 40 gramos.



Figura 4. Vainas y granos de frijol chaucha *Phaseolus vulgaris* L.

2.2. Las leguminosas en la nutrición humana

2.2.1. Composición nutritiva

Las leguminosas son plantas productoras de proteína por excelencia y se encuentran en las hojas y semillas, el contenido de proteína en frijol es 2-5 veces superior al de los cereales.

Las semillas de las leguminosas tienen un alto contenido en promedio de carbohidratos de 35% al 67%, siendo el principal constituyente el almidón, además tenemos la xilosa, celulosa y azúcares solubles en etanol (CUBERO Y MORENO, 1993 y BRUNO, 1990), en el Cuadro 1 se presenta la composición químico proximal del frijol.

El contenido de grasa es bajo entre 1-2% en promedio, siendo algo superior en garbanzos 6% y soya 18%. Las grasas de las leguminosas son

ricas en aceites esenciales, el ácido oleico y linoleico están contenidos en 60-65% del total de ácidos grasos.

Cuadro 1. Composición química del frijol.

Componentes	1	2	3
Humedad	9,68	NR	10,2
Proteína	18,71	19,73	22,5
Grasa	2,97	1,55	2,2
Cenizas	4,75	3,82	3,2
Fibra	3,15	NR	5,1
Carbohidratos	60,75	NR	61,9

NR: no reporta, 1: LOPEZ y BRASSANI (2008); 2: LEON *et al.*, 1993 (frijol de palo); 3: BEJARANO *et al.* (2002).

Existen dos tipos de vitaminas en las leguminosas: las hidrosolubles como la tiamina (B1) de 0,3-0,4mg/100g, niacina 16mg/100g, ácido fólico, ácido pantoténico y con escaso contenido la riovflavina (B2) de 0,1-0,4mg/ 100g, el ácido ascórbico (C) es muy escaso que son eliminados con las operaciones culinarias de cocción y almacenamiento y las liposolubles donde están el tocoferol y el caroteno (provitamina A) los valores de caroteno oscilan entre 50-300 U.I. de vitamina A/100g según el color y la variedad de especies. Una Unidad Internacional (U.I.) de vitamina A equivale a 0,3 µg de alcohol de vitamina A cristalina o retinol.

Entre los oligoelementos, se tiene: calcio 100mg/ 100g y hierro 7mg/ 100g, estos contenidos son absorbidos en un 10% debido en la presencia

de ácido fítico y oxalatos presentes en los vegetales (CUBERO Y MORENO, 1993 y BRUNO, 1990).

2.2.2. Factores antinutricionales

Las semillas de las leguminosas contienen numerosos compuestos con efectos antinutricionales sobre su valor nutritivo, algunos son termolábiles desapareciendo tras un adecuado tratamiento térmico, otros son termoestables, pudiendo desaparecer por lavado o cocido.

Entre los factores termolábiles están los inhibidores de la proteasa que inhiben la acción de las enzimas digestivas como tripsina y quimiotripsina; las lecitinas que son glicoproteínas capaces de unirse a azúcares específicos, los goitrógenos encontrados sólo en soya es un factor que causa bocio en animales y humanos. Los cianógenos, se produce a partir de un glucósido por la acción de una enzima presente en los tejidos vegetales; los factores antivitaminicos aumentan los requerimientos de la vitamina D y B12, tienen actividad antivitaminica E, relacionada a la presencia de α -tocoferol oxidasa. En los taninos condensados, el aumento considerable del valor nutritivo de las leguminosas al ser tratados térmicamente no parece estar relacionado con la presencia de factores antinutricionales como los antes mencionados, sino con taninos condensados similares a los existentes en sorgo. La testa de numerosas variedades de leguminosa contiene taninos condensados del tipo pro-antocianina, estos polímeros consisten en moléculas flavan-3-oles (Catequina, galocatequina) y flavan-3,4-dioles (leucocianidina, leucodelphinidina), y son oligómeros con diferente grado de polimerización.

Entre los factores termoestables están los alcaloides, que en la tribu *Phaseolae* se encuentran en la forma indol, tiramina, y/o feniletilamina, son responsables del amargor estando presentes en mayor o menor grado. Los aminoácidos tóxicos, ej. La canavanina típica de la *Papilionoideae*, las saponinas, se encuentran en las partes vegetativas como semillas de algunas leguminosas como glucósidos de sapogenina; las flavonas e isoflavonas y los fitatos, la importancia nutricional deriva de su gran poder quelante de iones metálicos calcio y magnesio y de microelementos como hierro y zinc, no obstante el fósforo contenido en los fitatos puede absorberse por acción de fitasas; factores de flatulencia, sus principales causantes son la rafinosa y la verbascosa, estos oligosacaridos desvían la digestión debido a la falta de la enzima α -galactosidasa en los hombres (CUBERO Y MORENO, 1993 y BRUNO, 1990).

2.3. Generalidades de los polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten las características de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (HERNÁNDEZ y GONZALES, 1999). Son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides, su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

Los polifenoles se forman en el reino vegetal a partir de la fenilalanina y la tirosina, e incluyen a los flavonoides, isoflavones, lignanos y taninos; en las legumbres el color de la cáscara está determinado por la presencia y cantidad de polifenoles tal como glicósidos, taninos condensados y antocianinas y estos actúan como antioxidantes (DOSS *et al.*, 2010).

2.3.1. Características de los Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que inicialmente se forman como glicósidos y están subdivididos en 6 clases: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, y antocianinas, que varían en sus características estructurales alrededor del anillo heterocíclico de oxígeno. A través de las diferencias en la composición de los glicósidos de flavonoides que ocurren de una planta a otra, los glicósidos de flavonoides derivan solo de unas cuantas agliconas (sin residuo de azúcar) y son absorbidos probablemente por el organismo humano en esas formas. (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

La estructura química de los flavonoides se basa en el anillo de flavano (Figura 5). La quercetina, kaempferol, myricitina, luteolina, apigenina son algunos ejemplos importantes de flavonoides presentes en las fuentes dietéticas (GUPTA *et al.*, 2010).

Los flavonoides protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, pueden interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno y son inhibidores de la lipoperoxidación, (GONZÁLEZ-TORRES *et al.*, 2000).

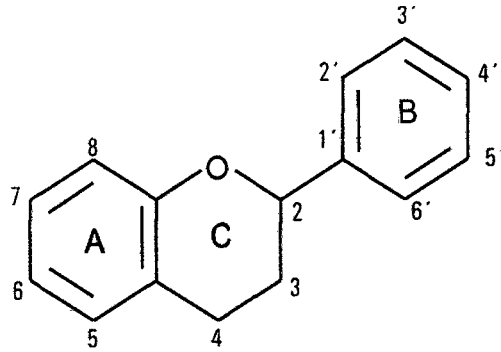


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides.

2.3.2. Quercetina

En la categoría de flavonol, la quercetina es el componente más abundante en vegetales y frutas presente mayormente en te, vino, cebollas, lechuga, repollo, brócoli, frijol, manzanas, melocotones trigo y en muchos otros, sus propiedades biológicas están asociadas a sus elementos: antibacterial, antiviral, antioxidantes antiinflamatorio y efectos anticarcinogénicos, (MAKRIS Y ROSSITER, 2001).

En alimentos la quercetina, está presente en forma de glicosilados mayormente como β -glicósidos y la naturaleza de la glicosilación influye en la eficiencia de la absorción de quercetina. La aglicona quercetina y sus glucósidos son absorbidos mejor que la quercetina administrada en forma no glucosídica, (WICZKOWSKI *et al.*, 2008). In vivo, la absorción y metabolismo de quercetina o de los glicósidos de quercetina se llevan a cabo en el intestino delgado (CRESPY *et al.*, 2001).

Recientes trabajos han demostrado beneficios efectivos en formulaciones tópicas conteniendo quercetina (emulsiones no aniónicas y

aniónicas), mostrando buena actividad antioxidante, al inhibir el estrés oxidativo e inflamación inducido por irradiación UVB (VICENTINI *et al.*, 2007).

2.3.3. Propiedades físicas y químicas de la quercetina

La quercetina es de color amarillo o algo anaranjado, normalmente es sólido cristalino con un sabor amargo, poco soluble en alcohol, soluble en agua, ácido acético glacial y en soluciones acuosas alcalinos (NTP-TECHNICAL REPORT, 1992). Es un radical hidroxilo (*OH) y con sus glucósidos sirven como poderosos antioxidantes porque muestran un potente efecto supresivo del daño al ADN inducido por H₂O₂ (HERNÁNDEZ Y GONZALES, 1999) también contra la peroxidación lipídica en fosfolípidos biliares y en lipoproteína humana de baja densidad (MAKRIS Y ROSSITER, 2001) y la inhibición es dependiente de la dosis.

Es un potente antioxidante y tiene propiedad antiradical hacia el radical hidroxilo, peroxilo, anión superóxido e inhibe la peroxidación de los lípidos comparado con otros flavonoides. Estas propiedades de la quercetina son debido a la presencia de 3 grupos funcionales químico activo en su estructura (Figura 6): (i) la configuración del 3´4- dihidroxi catecol en el anillo B que hace mas estable al radical fenoxi después de la donación del átomo de hidrogeno. (ii) el enlace doble 2,3 en conjunción con el grupo 4 carbonilo en el anillo C, (iii) el grupo 3-hidroxi en combinación con el doble enlace 2,3 incrementa la estabilidad del electrón a través de la molécula (VICENTINI *et al.*, 2007).

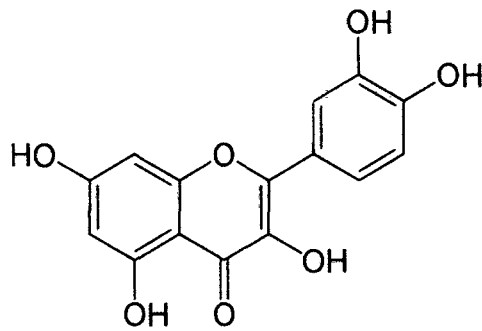


Figura 6. Estructura molecular de la quercetina.

2.4. Aspectos generales de la actividad antioxidante y radical libre

2.4.1. Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar o bloquear la acción oxidante de los radicales libres, manteniendo su estabilidad (AVELLO y SUWALSKI, 2006).

La oxidación en organismos vivos es esencial para la generación de energía en procesos biológicos. Sin embargo, el oxígeno de los radicales libres y otras especies de oxígeno, que son continuamente producidos in vivo trascienden en muerte celular y daño a los tejidos (CHYAU *et al.*, 2002).

2.4.1.1. Sistemas de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno y las especies

reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones en lípidos, proteínas, ADN, etc., funcionalmente vitales o más importantes (VENEREO, 2001).

2.4.1.2. Antioxidantes enzimáticos

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otros (HICKS *et al.*, 2006).

2.4.1.3. Antioxidantes no enzimáticos

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, cinc o vitaminas como la riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como co-factores de las enzimas antioxidantes (HICKS *et al.*, 2006).

2.4.2. Radicales libres

Los radicales libres son átomos, grupos de átomos o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados o libres, en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad por lo que son muy reactivos ya que tiende a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la

molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células (VENEREO, 2001).

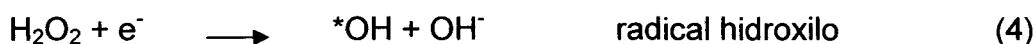
Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies (ELVIR, 1994).

Las fuentes de producción de radicales libres pueden ser: exógenos (que ingresan a través de la cadena alimenticia como antibióticos, medicamentos contaminantes, quimioterapia, la exposición a radiación ultravioleta e ionizante) o endógenos (que son sintetizados por la célula como autoxidación de catecolamina, fagocitosis, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, oxidación de carbohidratos), (AVELLO Y SUWALSKI, 2006).

2.4.3. Química del radical libre

El oxígeno molecular es un dirradical, conteniendo 2 electrones desapareados con una configuración espinal paralelo, como los electrones son opuestos al espinal que ocupa la misma orbita, los electrones añadidos al oxígeno molecular son transferidos uno a uno durante su reducción, produciendo diversos intermedios altamente reactivos. La reducción completa del oxígeno a H_2O requiere 4 pasos y la generación de diversos radicales libres y H_2O_2 , que no es un radical libre en sí, porque contiene electrones no apareados. El H_2O_2 es sin embargo considerado una especie reactivo de oxígeno (ROS) por su capacidad de generar radicales libres altamente reactivos a través de interacciones con transición de metales reactivos

(CLARKSON y THOMPSON, 2000). La completa reducción del oxígeno es expresado en las siguientes ecuaciones:



2.4.4. Especies Reactivas del Oxígeno (ERO)

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (AVELLO y SUWALSKI, 2006).

Entre los radicales libres, por su importancia, están algunas especies reactivas del oxígeno (ERO) y los lipoperóxidos o peróxidos lipídicos. Las ERO con alto potencial reactivo son: el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH). Por su parte, los lipoperóxidos (R-COO) son moléculas de ácidos grasos en las que el grupo hidroxilo de la formación carboxilo se halla en un estado de singlete activado, confiriéndole propiedades de radical libre. El mecanismo oxidante de los radicales libres está íntimamente ligado a su génesis, la cual sigue una secuencia de reacciones en cadena (BENITEZ, 2006).

2.4.5. Radicales sintéticos

2.4.5.1. Radical DPPH (1, 1 difenil-2-picril-hidrazil)

La capacidad para secuestrar los radicales DPPH está en función al contenido del principio activo presente en cada una de las plantas en estudio.

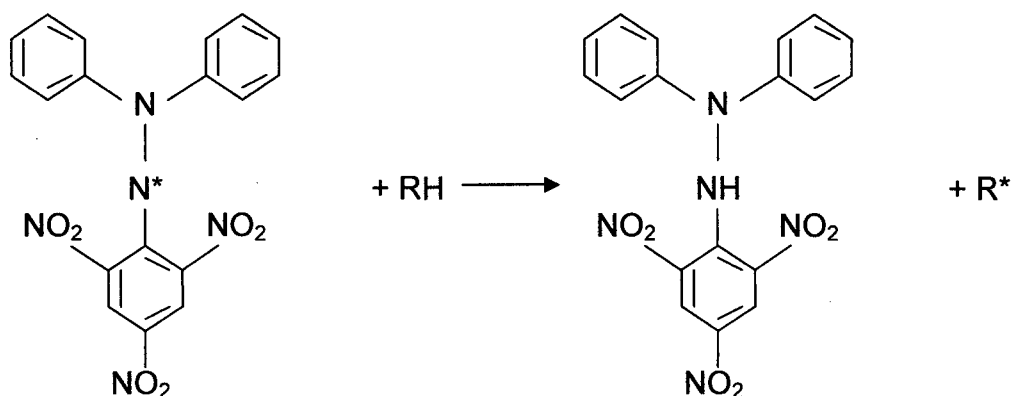
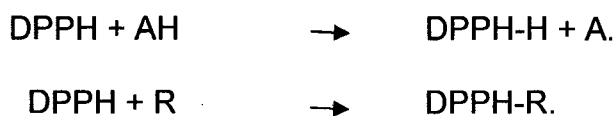


Figura 7. Reacción del radical DPPH con un antioxidante.

El principio del método de DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ejemplo compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical (GARCIA *et al.*, 2001). La reducción de la concentración del DPPH está indicada como el decremento de la absorvancia en el tiempo. Según Brand-Williams *et al.* (1995) citado por (SANDOVAL *et al.*, 2001) la reacción producida es la siguiente:



2.4.5.2. Radical peroxilo (ABTS)

Actualmente el método ABTS según (JANASZENSKA y BARTOSZ, 2002) es muy usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El ABTS, generador del radical libre 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-ácidosulfónico) presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El ABTS•+ una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP 2,2'-azobis-(2- midinopropeno), presenta nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm. El radical generado químicamente (persulfato potásico) fue validado por su estabilidad, la reacción es relativamente rápida comparada con el DPPH. La alta reactividad de este radical influye directamente en la obtención del IC₅₀. Asimismo es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734) reduciendo posibilidades de interferencia de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacción secundaria, (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de Biotecnología en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicado en Av. Universitaria s/n, distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; a una altitud de 667 m.s.n.m. con clima tropical húmedo y con una temperatura promedio 24°C y humedad relativa media de 89%.

3.2. Materia prima

Se empleó dos especies de semillas de frijoles desarrollados pero no secos: frijol de palo (*Cajanus cajan* L.) y frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.), procedentes de la zona Alto Huallaga, fueron colectados en el mercado modelo de la provincia de Leoncio Prado.

3.3. Materiales y equipos de laboratorio

3.3.1. Materiales de Laboratorio

- Matracas erlenmeyer de 150, 250 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 80, 100, 250 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Micropipetas 10-50 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L.

- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL.
- Fiolas de 10, 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL.
- Cubetas de poliestireno, Gene Mate® (1cmx1cmx4,5 cm).
- Tips, FISHERBRAND® (1000 y 200 µL).
- Microtubos (1,5-2,00 mL).
- Frascos color ámbar (250, 500 mL)
- Bolsa de polietileno de alta densidad.
- Papel filtro nº 42 fino (whatman).

3.3.2. Equipos de laboratorio

- Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation).
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión).
- Estufa eléctrica modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead).
- Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich).
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SI™).
- Baño Maria modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- Refrigeradora Ice beam Door Cooling LG GR-5392QLC.
- Molino de grano de 1 mm de luz.
- Balanza analítica modelo SCOUT PRO SP2001 (Ohaus).
- Sonicador modelo KD-05AB, JACUltrasonic.(Lab. Corporation).

3.3.3. Reactivos y soluciones

- Ácido gálico al 98,1% Sigma Aldrich.
- Quercetin hydrate, 95% Sigma Aldrich.

- 1,1-Diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azobis (2-amidino-propane)(ABAP; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE).
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Etanol al 99.99% Merck KGaA.
- Folin-Ciocalteu phenol reagent, 2N, Sigma Aldrich.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) p.a. ISO. Scharlau.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) en lentejas p.a. ISO. Merck. Germany.
- Agua destilada desionizada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$).
- Ácido clorhídrico pureza: 36,01%, Merck. Germany.

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó según el método de Folin-Ciocalteu, reportado por SANDOVAL *et al.* (2001).

3.4.2. Cuantificación de quercetina

Se realizó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por TOKUSOGLU *et al.* (2003).

3.4.3. Radical DPPH (2,2-diphenyl-picrilhydrazyl)

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) reportado por SANDOVAL *et al.* (2001).

3.4.4. Radical peroxilo (ABTS)

Se empleó el método de ABTS reportado por SANDOVAL *et al.* (2001).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Preparación de las muestras

Para la obtención de las muestras en estudio se siguió el Flujograma (Figura 8) y se detalla a continuación:

- **Recepción:** En el laboratorio se recolectó las semillas en vainas verdes del frijol chaucha y palo.
- **Desvainado:** En esta operación, los granos de frijol fueron liberados manualmente de la vaina que los contiene.
- **Separación:** Esta operación fue manualmente, consistió en separar la cáscara y cotiledón.
- **Secado:** El secado se realizó a 45°C/48 horas para eliminar la humedad.
- **Molido:** La molienda se realizó en un molino de granos con malla 1mm de luz, para reducir el tamaño de las partículas.
- **Envasado:** se envasó en bolsas de polietileno de alta densidad y se sellaron herméticamente.
- **Almacenamiento:** se almacenó a -20°C hasta el momento de análisis.

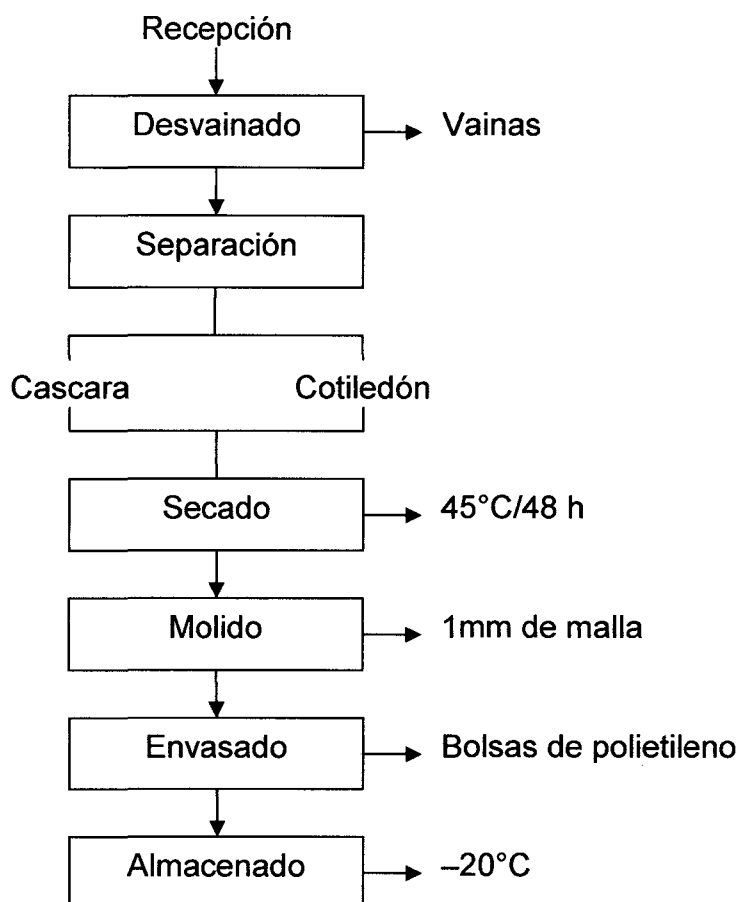


Figura 8. Flujograma de operaciones para la obtención de muestras.

3.5.2. Preparación de los extractos

Para la evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante (radical DPPH y peroxilo) se procedió según la Figura 9. Se pesó 20g de muestra seca pulverizada en un frasco ámbar a la que se le añadió 100mL de etanol al 70%(v/v) obteniendo una solución stock de 200 mg/mL de concentración, se tapó herméticamente y se dejó macerar por 24 horas a temperatura ambiente, luego las muestras se filtraron. Seguidamente el líquido filtrado se centrifugó a 1000 rpm / 10 min. a 4°C. Finalmente se

realizaron las diluciones respectivas para cada una de las pruebas. Los tratamientos en estudio fueron: cotiledón de frijol palo (**MP**); cáscara de frijol palo (**CP**); cotiledón de frijol chaucha (**MC**); cascara de frijol chaucha (**CC**).

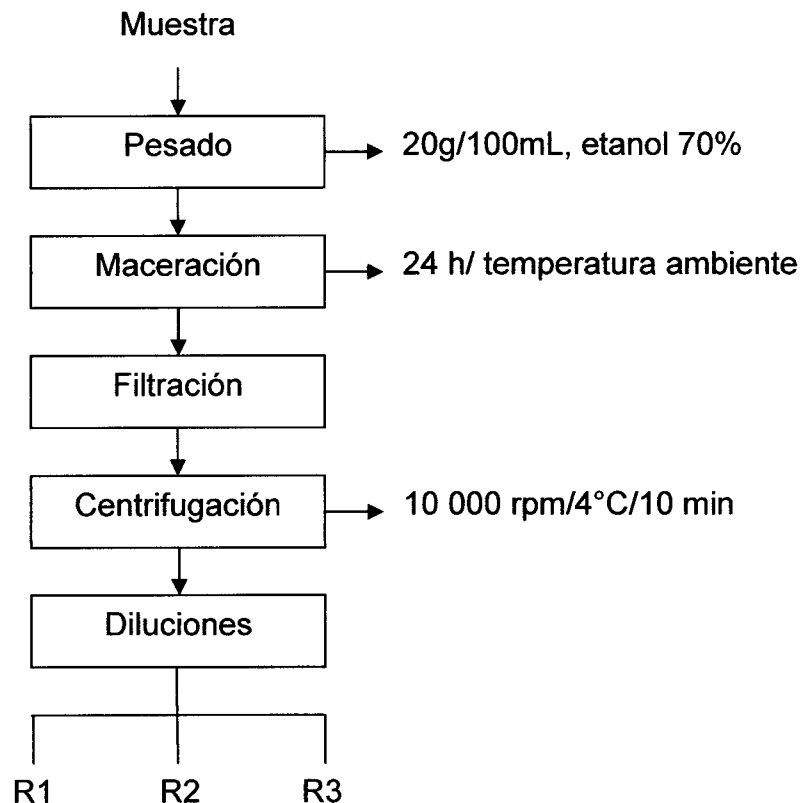


Figura 9. Secuencia de operaciones en la preparación de extracto etanólico.

3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales de dos especies de frijol

3.5.3.1. Determinación de la curva estándar

Para determinar la curva estándar de polifenoles totales se preparó solución de ácido gálico a diferentes concentraciones según el Cuadro 2. En tubos de ensayo de 10mL, se añadió 1,58mL de agua desionizada, 20µL de control y estándares (agua desionizada), luego se le agregó 100µL de

solución fenol Folin-Ciocalteu, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se neutralizó la reacción añadiendo 300 μ L de Na₂CO₃ al 20%, se dejó incubar por 2 horas, a temperatura ambiente.

Cuadro 2. Preparación de la curva estándar de polifenoles totales.

Concentración (μ g/mL)	ácido gálico (μ L)	Etanol 70% (μ L)	Volumen final (μ L)
0,0625	42	958	1000
0,1250	83	917	1000
0,2500	167	833	1000
0,5000	333	667	1000
1,0000	667	333	1000
1,5000	1000	0	1000

La lectura de la absorvancia se efectuó a 700 nm, los resultados fueron ploteados considerando la concentración vs las absorvancia, con los que se obtuvo la ecuación matemática y se determinó el coeficiente de correlación.

3.5.3.2. Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles totales se tomó alícuotas del extracto etanólico (Figura 9). Estas alícuotas se centrifugaron a 4°C, 10,000 rpm/ 10 min. Se preparó concentraciones intermedias por quintuplicado de cada una de las muestras (Cuadro 3). Seguidamente se trabajó igual que la curva patrón con la única variación que en lugar de los 20 μ L del control se adicionó la misma cantidad de muestra en estudio, se tomó

la lectura de la absorbancia a 700 nm. Las muestras fueron analizadas siguiendo el diseño experimental de la Figura 12.

Cuadro 3. Preparación de concentraciones para la cuantificación de polifenoles totales.

Tratamientos	Concentración		Muestra	Etanol 70%	volumen
	mg/mL	FD	μL	μL	total μL
MP	400	1	1000	0	1000
CP	200	1	1000	0	1000
MC	400	1	1000	0	1000
CC	10	20	990	10	1000

MP=cotiledón de frijol palo, CP= cascara de frijol palo, MC= cotiledón de frijol chaucha, CC= cáscara de frijol chaucha.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles totales fue evaluado mediante el diseño completo al azar (DCA), en los niveles de significancia se aplicó la prueba de Tuckey $P < 0,05$, los cálculos se realizaron en el programa InStatGraphic.

3.5.4. Cuantificación de quercetina en dos especies de frijol

La preparación de muestras se realizó según el Flujograma de la Figura 10. Que implicó una hidrólisis acida, seguido de un agitado vigoroso con calentamiento, se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se sometió a una sonicación con la finalidad de liberar el oxígeno atrapado en las células presentes en la solución y finalmente se filtró con papel whatman n° 40 para separar el sobrenadante.

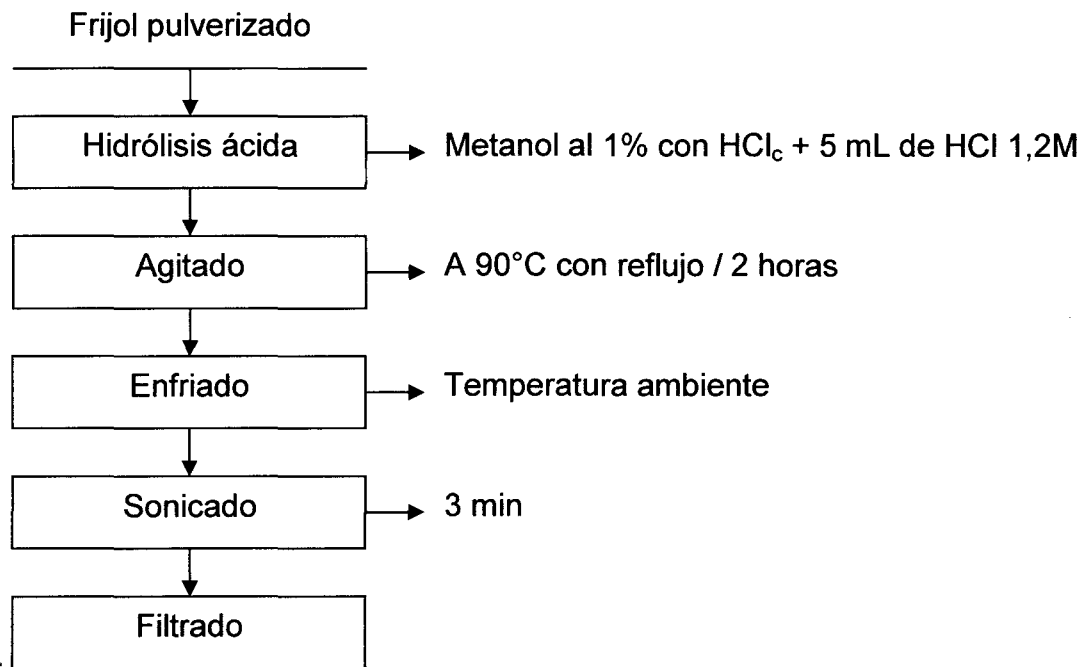


Figura 10. Flujograma de preparación de muestra para la cuantificación de quercetina.

3.5.4.1. Determinación de la curva estándar de quercetina

Se preparó una solución stock de 1mg/mL de concentración (0,002g de quercetina/ 2mL metanol al 99.9%) a partir de ésta se generaron soluciones a diferentes concentraciones: 1; 0,5; 0,25; 0,1 y 0,05mg/mL por triplicado como se muestra en el Cuadro 4. La lectura se realizó a 266 nm; con los valores de concentración vs absorvancia se halló la ecuación matemática y el coeficiente de correlación.

Cuadro 4. Preparación de la curva estándar de quercetina.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Quercetina (μL)	Metanol (μL)	Volumen final (μL)
0,005	5	995	1000
0,010	10	990	1000
0,025	25	975	1000
0,050	50	950	1000
0,100	100	900	1000

3.5.4.2. Cuantificación de quercetina

Para esta evaluación se pesó 5g de muestra pulverizada en un frasco, se añadió 25 mL de metanol acidificado 1% (v/v) de HCl concentrado, en seguida se adicionó 5mL de HCl 1,2M. La mezcla fue agitado con el frasco tapado herméticamente a 90°C bajo reflujo por 2 horas, el extracto fue enfriado a temperatura ambiente por 30 min, luego se sonicó por 3 min, el extracto final fue filtrado y centrifugado a 10,000 rpm, a 4°C/ 5 min., finalmente se prepararon las diluciones para todas las muestras fue 10 y para cáscara frijol chaucha fue (CC) 100 y se procedieron a tomar las respectivas lecturas a 266 nm por triplicado. La distribución de los tratamientos se presenta en la Figura 11.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de quercetina fue evaluado mediante el diseño completo al azar (DCA), en los niveles de significancia se aplicó la prueba de Tuckey $P < 0,05$, los cálculos se realizaron en el programa InStatGraphic.

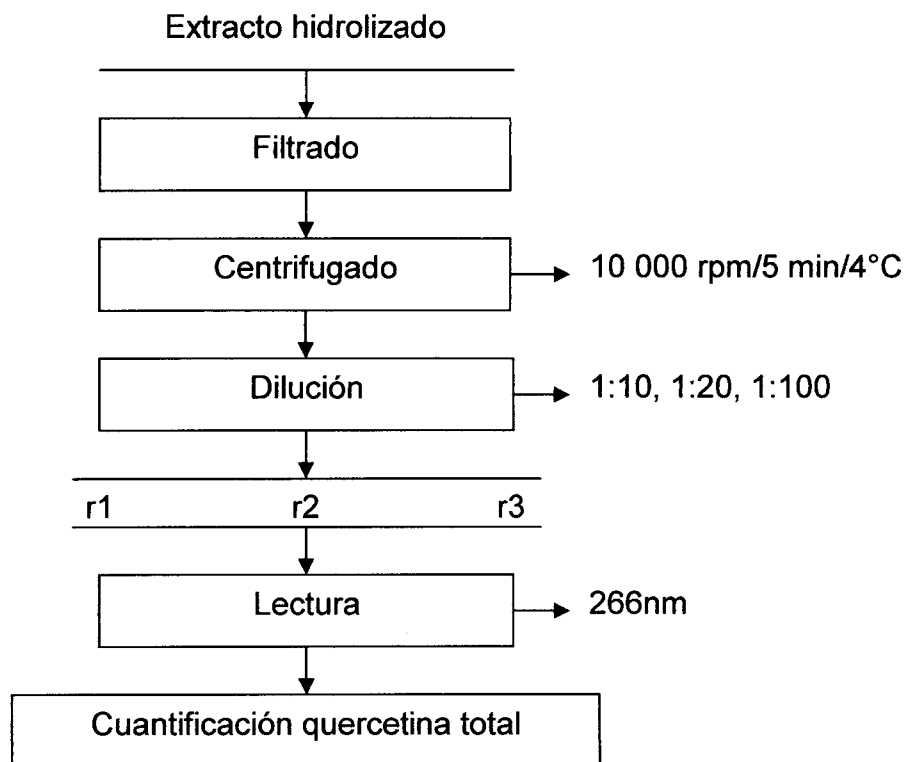


Figura 11. Secuencia para la cuantificación de quercetina.

3.5.5. Evaluación de la capacidad antioxidante en dos especies de frijoles

3.5.5.1. Coeficiente de Inhibición IC_{50} del radical DPPH

Se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en etanol al 99%, se agitó hasta la disolución total y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de esta solución stock se preparó 20 mL de DPPH a 100 μ M (segunda solución) como concentración final para medir la capacidad de secuestro de las muestras experimentales, la concentraciones de muestra fueron 10 000; 7 000; 4 000; 1 000 μ g/mL, se prepararon soluciones stocks de

200mg/mL (Figura 9). A partir del stock se generaron soluciones intermedias (Cuadro 13 del Anexo C) semejantes para cada tratamiento.

A una cubeta de poliestireno de 1x 1 x 4.5 cm se adicionó 50 µL de la muestra y 950 µL del radical DPPH a 100 µM que son similares para todos los tratamientos MP, CP, MC y CC, la lectura se realizóa 515 nm con un tiempo de 10 min e intervalos de tiempo de 30 segundos. La inhibición de los radicales libres DPPH* es determinado por la decoloración de la solución de violeta a amarillo. Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH por los tratamientos en estudio se utilizó la siguiente expresión:

$$\%InhibicionDPPH = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Donde: *Abs Control*: Absorvancia del control (radical DPPH)

Abs Muestra: Absorvancia de la muestra en estudio a 10 min.

Los resultados obtenidos del coeficiente de inhibición del radical DPPH fue evaluado mediante el diseño completo al azar (DCA), en los niveles de significancia se aplicó la prueba de Tuckey $P < 0,05$, los cálculos se realizaron en el programa InStatGraphic.

3.5.5.2. Coeficiente de Inhibición IC_{50} del radical peroxilo

Se prepararon las siguientes soluciones: 100mL de ABTS a 2,25 mM, 100mL ABAP a 20 mM, 1l de solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,7 mM y fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 1,5 mM. La preparación de radical peroxilo consistió en mezclar 10 mL de solución de ABTS, 10mL ABAP y 80 mL de PBS (pH 7,4), se incubó a 70°C en baño

maría/15 min. obteniéndose una solución de color azul brillante y se dejó enfriar sobre hielo aproximadamente 30 min. Paralelamente a esto se prepararon soluciones intermedias partiendo de la solución stock 200mg/mL (Cuadro 15 del Anexo C) semejante para cada uno de los tratamientos

La evaluación del radical ABTS se efectuó a partir de la adición de 10µL de las concentraciones intermedias (2000; 1200; 400 y 40 µg/mL con 990µL de la solución stock del radical ABTS. La lectura se realizó a 414 nm con un tiempo de 10 min e intervalos de tiempo de 30 segundos. El decrecimiento de la absorvancia es determinado por la decoloración de la solución de radicales ABTS. El porcentaje de la inhibición del radical ABTS fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%InhibicionPeroxilo = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Donde: *Abs Control*: Absorvancia del control (radical peroxilo)

Abs Muestra: Absorvancia de la muestra en 10 min.

El Coeficiente de Inhibición (IC₅₀) se determinó mediante el análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición vs la concentración de los extractos etanólicos 70% de cada una de los tratamientos en estudio necesarios para inhibir el 50% de radicales libres Brand-Williams *et al.* (1995) reportado por SANDOVAL *et al.* (2001). Los resultados obtenidos del coeficiente de inhibición IC₅₀ del radical peroxilo fue evaluado mediante el diseño completo al azar (DCA), en los niveles de significancia se aplicó la prueba de Tuckey P< 0,05, los cálculos se realizaron en el programa InStatGraphic. El diseño experimental de la investigación se presenta en la

Figura 12 para la evaluación de polifenoles, quercetina y el coeficiente de Inhibición IC_{50} (mg/mL) del radical DPPH y peroxilo.

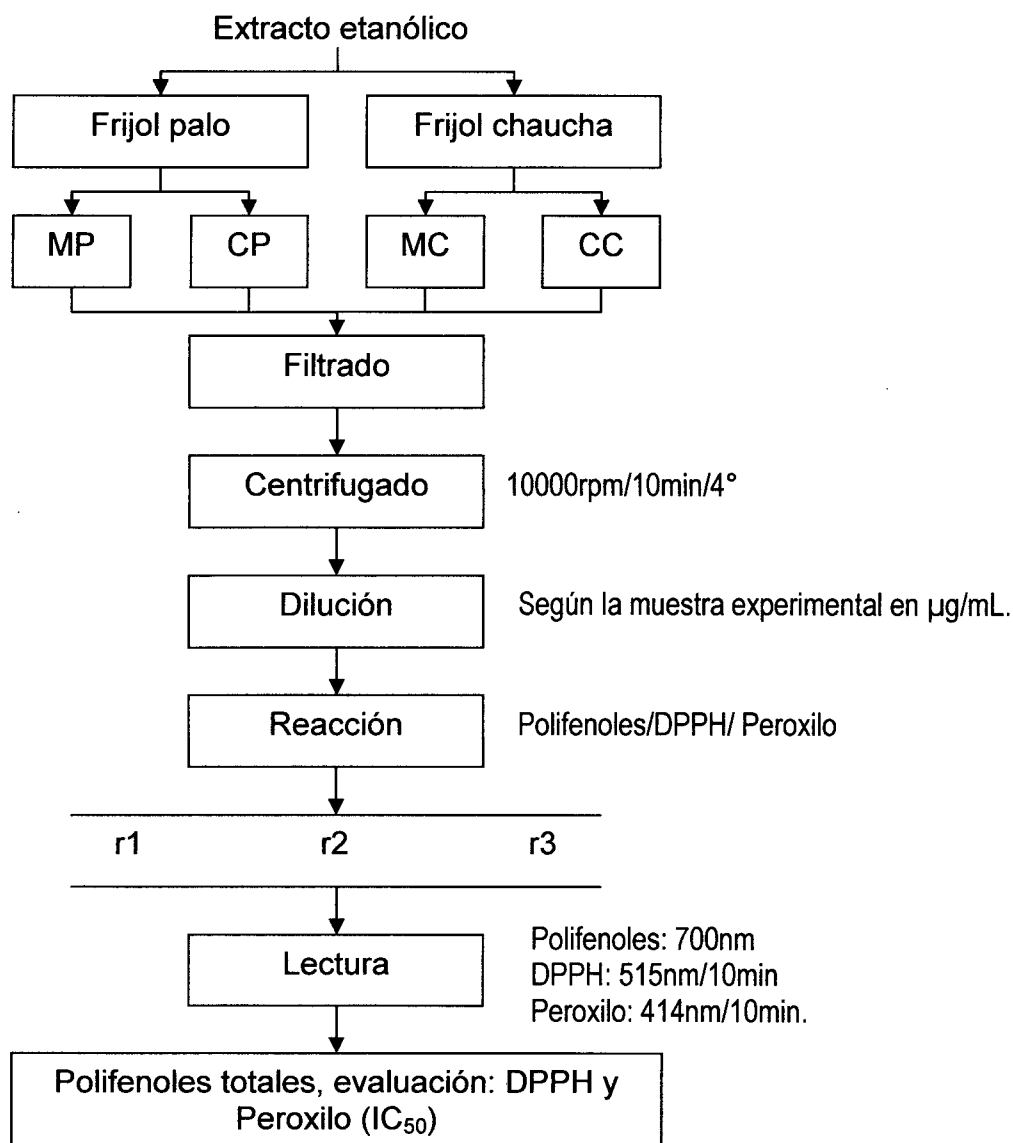


Figura 12. Diseño experimental para cuantificación de polifenoles totales y coeficiente de Inhibición IC_{50} del radical DPPH y peroxilo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuantificación de polifenoles totales en la cáscara y cotiledón de dos especies de frijoles

Los frijoles son una de las principales fuentes de proteína, caloría, vitaminas del complejo B y minerales así como de fibra y polifenoles tal como flavonoides, isoflavonas, ligninas y taninos, existe una gran infinidad de frijoles que varían por sus características fisiológicas como colores, tamaño y otros factores; en nuestra localidad es muy reconocido el frijol de palo (*Cajanus cajan* L.) y el frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.), cada uno con características peculiares.

En el Cuadro 5 y Figura 13 se muestra los resultados del contenido de polifenoles totales en cotiledón y cáscara de dos especies de frijoles que crecen en la zona de Tingo María, frijol de palo (*Cajanus cajan*) y frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris*), estos valores fueron obtenidos en base al modelo matemático (Cuadro 10 y Figura 18 del Anexo A). Del análisis estadístico (Cuadro 11 del Anexo A) podemos indicar que existe diferencia significativa entre los tratamientos, comparando los promedios mediante la prueba de Tuckey ($p < 0,05$) se encontró que el mayor contenido de polifenoles esta en el tratamiento CC (cáscara de frijol chaucha) $2,747.8 \pm 52,89$ mg EAG/100g y el menor contenido lo presentó el tratamiento CM (cotiledón de frijol chaucha) $24,176 \pm 0,74$ mg EAG/100g.

Cuadro 5. Contenido de polifenoles totales en la cáscara y cotiledón de dos especies de frijol.

			polifenoles totales
Frijol	Partes	Tratamiento	Mg AGE/100g *mf
Palo	cotiledón	MP	38,492 ± 0,50 ^b
	cascara	CP	54,725 ± 0,18 ^b
Chaucha	cotiledón	MC	24,176 ± 0,74 ^b
	cascara	CC	2747,8 ± 52,84 ^a

*mf representa valores en base húmeda, Los valores representan el promedio ± SEM, Los valores en una misma columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

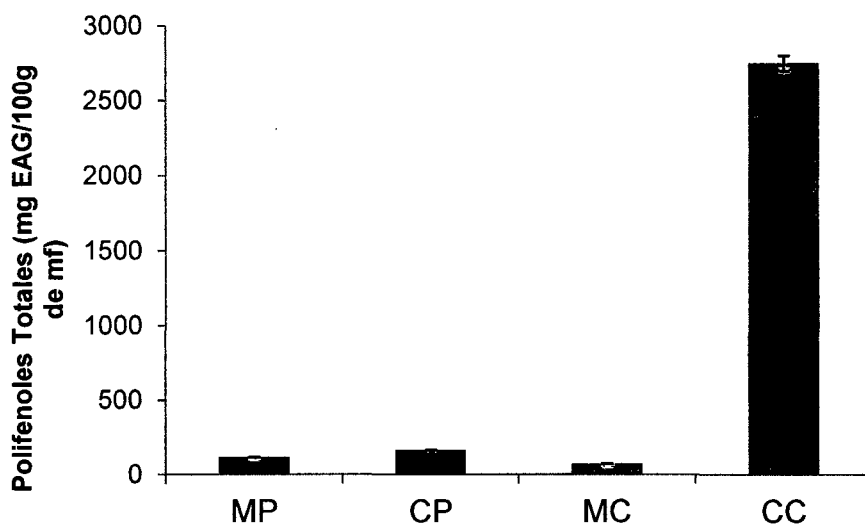


Figura 13. Comparación del contenido de polifenoles totales entre los tratamientos.

MASUM *et al.* (2011) reportaron resultados en varios genotipos de frijol en el siguiente orden decreciente basado en los valores promedios black>small

red >great Northern> Pinto >Navy> Snap siendo los de color oscuro de mayor capacidad antioxidante que los poco coloreados. Con respecto al frijol de palo *Cajanus cajan* el contenido de polifenoles totales en la cáscara y cotiledón ($54,725 \pm 0,18$ mg EAG/100g y $38,492 \pm 0,50$ mg EAG/100g respectivamente), presenta diferencias significativas; autores como SREERAMULU *et al.* (2009) reportan valores en frijol Red gramdhal (*Cajanus cajan*) $229,33 \pm 3,34$ mg EAG/100g; OBOH (2006) reporta en frijol *C. cajan* (Brown) $1,2 \pm 0,2$ mg EAG/g y en *C. cajan* (White) $0,4 \pm 0,1$ mg EAG/g; finalmente SREERAMULU *et al.* (2009) reportaron en cereales un rango de 47,64–373,15 mg EAG/100g y en leguminosas 62,35–418,34 mg EAG/100g éstos valores son ligeramente superiores a los obtenidos en el presente trabajo.

Comparando el valor que se reporta en cáscara de frijol chaucha (2747,8 mg EAG/100g) con otros tipos de alimentos como la cáscara de uva $5,370 \pm 0,29$ mg EAG/100g, ZHI Y HOWARD (2005); en lentejas (*Lens esculenta*) $112,91 \pm 3,19$ mg EAG/100g en soya 100,54 mg EAG/100g y en frijol Rajmah (*Phaseolus vulgaris*) $332,94 \pm 8,06$ mg EAG/100g datos reportados por SREERAMULU *et al.* (2009); así como BOATENG *et al.* (2007) reportaron en frijol crudo 612,10 mg EAG/100g; ROCHA-GUZMAN *et al.* (2007) reportaron en frijol Black Otomy $9,23 \pm 0,10$ mg EAG/100g y en frijol yellow peruano-87 $5,38 \pm 0,49$ mg EAG/100g se observa un amplio rango de valores.

VARGAS-ALVAREZ *et al.* (2004) sostienen que el contenido de los flavonoides varía sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edad y daños que pudren el tejido vegetal. Asimismo KIM *et al.* (2003) también mencionan que la distribución y composición de fitoquímicos fenólicos son

afectados por el manejo, practicas horticulturales, cultivares, origen geográfica, almacenamiento, etc.; además puede deberse al tipo de extracto empleado (acuoso, etanólico, metanólico, etc.), en el presente trabajo se utilizó extracto etanólico al 70%, MONROY *et al.* (2004) sostienen que el agua tiene una polaridad más alta que el etanol, la presencia de compuestos orgánicos son más solubles en etanol que en agua y sensibles al reactivo fenol de Folin-Ciocalteu, esto provoca diferencias en la cantidad de polifenoles extraídos.

Por otro lado los resultados indican que los polifenoles están mayormente ubicados en la cáscara de las semillas sobre todo coloreadas, en estudios realizados por ROCHA-GUZMAN *et al.* (2007), demuestran que los compuestos fenólicos no flavonoides fueron localizados mayormente en el cotiledón, mientras que los flavonoides en la cáscara de la semillas de colores oscuros, de igual modo REYNOSO.CAMACHO *et al.* (2006), indica que el color de la semilla de frijol esta determinado por la presencia y concentración de compuestos polifenólicos y estos son mayormente flavonoides tales como glicósidos de flavonol, antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas) el más ampliamente distribuido.

4.2. Cuantificación de quercetina en dos especies de frijol

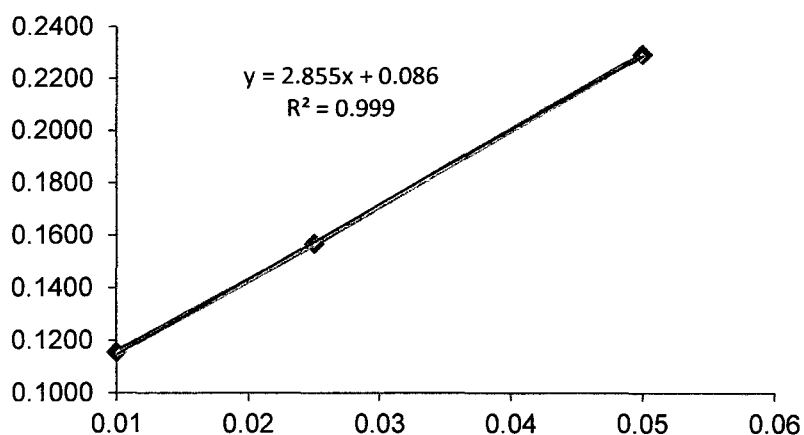
4.2.1. Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de quercetina en las muestras de frijoles fue necesario elaborar una curva estándar cuyos resultados se presenta en el Cuadro 6 y Figura 14.

Cuadro 6. Concentraciones de quercetina para la curva estándar.

Repeticiones	Concentraciones (mg /mL)				
	1	0,05	0,025	0,01	0,005
1	0,459	0,309	0,264	0,079	0,008
2	0,406	0,343	0,168	0,096	0,010
3	0,440	0,312	0,146	0,096	0,093
Promedio	0,435	0,321	0,193	0,090	0,037

Se obtuvo un modelo matemático que sirvió de base para la cuantificación de quercetina en las muestras de frijol y el valor R fue 0,999; lo que significa según MURRAY (1969) que existe un buen grado de correlación entre las variables X (concentración de quercetina) y la variable Y (absorbancia), debido a que se halla una relación proporcional entre las variables.

**Figura 14.** Curva estándar de quercetina.

Asimismo HERNANDEZ *et al.* (2001), mencionan que tales correlaciones se expresan en hipótesis sometidas a pruebas. El mismo autor sostiene que la utilidad y el propósito principal de las correlaciones cuantitativas son saber cómo se puede comportar un concepto a una variable conociendo el comportamiento de otras variables relacionadas.

Para la curva estándar se debe utilizar sustancias puras para estudiar el comportamiento del componente y evitar interferencias con otros compuestos o impurezas; en el presente trabajo para la curva estándar se utilizó quercetina con 99% de pureza, cuya fórmula química es $C_{15}H_{20}O_7$, peso molecular 302,23, según BADUI (1988) su máxima absorción es 258 y 375 nm y presenta actividad antioxidante.

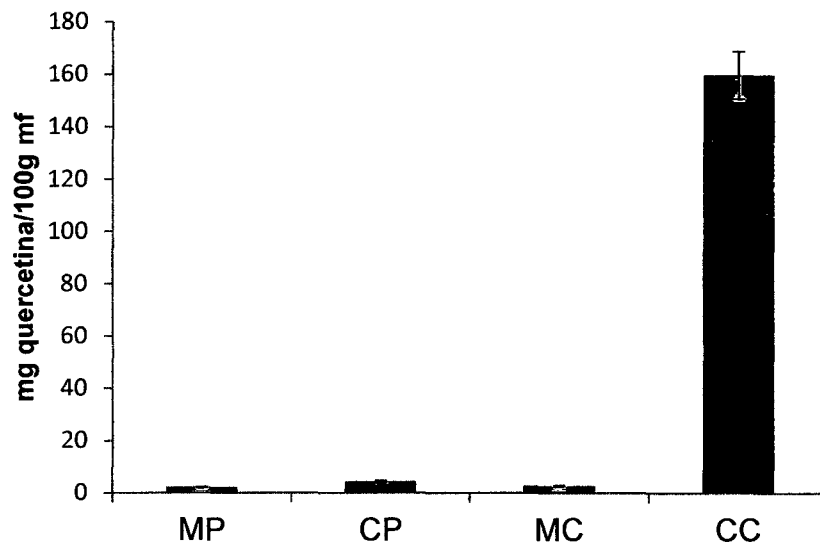
4.2.2. Cuantificación de quercetina

La quercetina es un flavonoide vegetal del tipo flavonol, se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los vegetales y frutas, por lo que es considerado un componente común en la dieta humana, este fitoquímico anticancerígeno que inhibe la proliferación y el crecimiento de células tumorales, ejerce múltiples efectos bioquímicos en las células de los mamíferos, la inhibición de actividades enzimáticas tales como las de proteinquinasa y Rotein-tirosin-quinasa.

Cuadro 7. Contenido de quercetina en dos especies de frijol.

Frijol	Partes planta	Tratamiento	mg quercetina/100g mf*
Palo	cotiledón	MP	2,087 ± 0,15 ^b
	casaca	CP	4,291 ± 0,34 ^b
Chaucha	cotiledón	MC	2,711 ± 0,21 ^b
	casaca	CC	159,67 ± 9,00 ^a

*mf base húmeda, Los valores representan el promedio ± SEM, una misma columna con diferente superíndice diferentes ($p < 0,05$).

**Figura 15.** Comparación del contenido de quercetina entre los tratamientos.

En el Cuadro 7 y Figura 15 se muestran los resultados de la quercetina; según el análisis estadístico (Cuadro 12 del Anexo B) existe diferencia altamente significativa. Comparando los valores promedios, encontramos que el mayor contenido lo presentó la cáscara de frijol chaucha (CC) 159,67±9,00 mg quercetina/100g y el menor contenidos se encontró en

MP, CP y MC ($2,087 \pm 0,15$, CP $4,291 \pm 0,34$ y MC $2,711 \pm 0,21$ mg Quercetina/100 g) respectivamente, VARGAS-ALVAREZ *et al.* (2004) sostienen que en las especies de frijoles los flavonoides varían fundamentalmente entre genotipos, cambios estacionales, edad, daño de la hoja y sitios de ubicación, además indica que las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque los sintetiza como defensa contra predadores herbívoros que los prefieren por su mayor calidad nutricional respecto a las hojas maduras.

Comparando el valor del frijol palo *Cajanus cajan* L. (cotiledón y cascara) y *Phaseolus vulgaris* L. (cotiledón) son similares (2-4 mg), por el contrario en cáscara de frijol chaucha se reportó $159,67 \pm 9,0$ mg quercetina/100g, según OCHO-ANIN *et al.* (2010) en la evaluación de compuestos bioactivos en semillas secas de *Phaseolus vulgaris* indica 31mg quercetina/100g, otros autores como HALL III (s/d) reportan 2,5mg quercetina/100g en trigo; VARGAS-ALVAREZ *et al.* (2004) evaluaron en diferentes partes anatómicas del árbol de guayabo y reportaron el mayor contenido en el botón floral 203,6 mg quercetina/100g seca y el menor contenido en el fruto 12,6 mg quercetina/100g; además el mismo autor menciona que los flavonoides varían para la época del año, incidencia de luz, características edafológicas y la especie; además la biosíntesis de los flavonoides esta secuenciada, siendo la quercetina el producto final de la flavonoles y flavones antes de formar taninos. Asimismo WICZKOWSKI *et al.* (2008) indican que la quercetina está presente mayormente en té, vino, cebolla, lechuga, brócoli, frijol, manzana, trigo y otros alimentos.

En otros estudios OCHO-ANIN *et al.* (2010), caracterizó los principales constituyentes bioactivos del frijol *Phaseolus vulgaris* L. y reveló que estas semillas contienen alcaloides, glicósidos de flavonoides, polifenoles, taninos y terpenoides y todos ellos son los mayores grupos fitoquímicos con actividades biológicas, asimismo, GALVEZ-RANILLA *et al.* (2007), confirma que los taninos condensados y flavonoides tales como kaempferol y glicósidos de quercetina fueron mayormente encontrados en la cáscara de la semilla y los cotiledones fueron ricos en ácidos fenólicos tal como ácido ferúlico, sinápico, clorogénico y otros.

4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en dos especies de frijol

4.3.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH

La familia de las leguminosas son producidos y consumidos a nivel mundial debido a que son ricos en lisina y tripsina pero bajo en contenido de aminoácidos azufrados, sin embargo se ha demostrado que contienen polifenoles tales como flavonoides, isoflavonas y lignanos, que les confieren propiedades antioxidantes.

En el Cuadro 8 y Figura 16 se presenta La evaluación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical DPPH en las especies de frijol (Cuadro 14 del Anexo C) muestra mediante la prueba Tuckey ($p < 0,05$) que existe diferencia estadística significativa, observándose que la cáscara del frijol chaucha (*Phaseolus vulgaris*) presentó la mayor eficacia en la captura del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil IC_{50} 0,032mg/mL, seguido del frijol palo (*Cajanus cajan*) $6,28 \pm 0,10$ mg/mL.

Cuadro 8. Comparación del coeficiente de Inhibición IC_{50} (DPPH) en dos especies de frijol.

Frijol	Parte	Tratamiento	IC_{50} (mg/mL)
Palo	cotiledón	MP	$21,63 \pm 0,26^d$
	cascara	CP	$6,28 \pm 0,10^b$
chaucha	cotiledón	MC	$20,64 \pm 0,14^c$
	cascara	CC	$0,032 \pm 0,00^a$

Los valores representan el promedio \pm SEM. Los valores en una misma columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

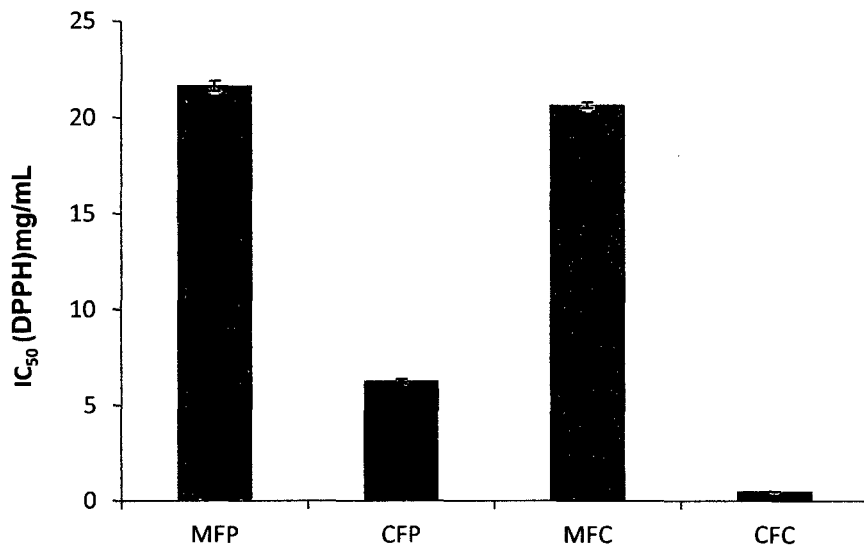


Figura 16. Comparación entre la eficiencia de los tratamientos frente al radical DPPH.

Al respecto MASUM *et al.* (2011) en el trabajo referido a diferentes genotipos de frijoles indican que los frijoles coloreados tienen gran propiedad antioxidante y antirradical comparados con los frijoles poco coloreados. A su vez XUT Y CHANG (2009), sostienen que la actividad antioxidante en los frijoles

pintos esta dado por flavonoides y ácidos fenólicos y en frijol negro esta actividad lo da las antocianinas, flavan-3-oles y flavonoles.

Según los resultados de la investigación el coeficiente de la inhibición del radical DPPH en cotiledón y cáscara de ambos frijoles fue diferente, en cotiledón fluctuaron IC_{50} 20-21mg/mL y en cáscara IC_{50} 0,032 a 6 mg/mL. Según HEIMLER *et al.* (2005), quienes encontraron valores de IC_{50} de 39-2810 mg/mg de DPPH en frijoles. KONG *et al.* (2009) reportaron en extracto etanólico IC_{50} 0,2259mg/mL; OOMAH *et al.* (2010), en extracto acetona 70% en cáscara de frijol negro como mejor al COX-1 con IC_{50} 1,2 μ g/mL y COX-2 con IC_{50} 38 μ g/mL, la determinación de la cuantificación de la actividad antioxidante es variado existe alrededor de 20 índices para expresar esta propiedad entre ellos esta el radical DPPH, FRAP, TROLOX, AOA entre otros, el mismo autor reporta para frijoles rajmah (*Phaseolus mungo* Roxb) un valor de DPPH 1,07 Trolox equivalente mg/mL y para FRAP 373 μ mol/g.

4.3.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo

En el Cuadro 9 y Figura 17 se presenta la comparación de los coeficientes de inhibición del radical peroxilo en dos especies de frijol en el cotiledón y cáscara. Realizando el análisis estadístico de los resultados se encontró que existió diferencia estadística significativa (Cuadro 16 del Anexo C), comparando los medios encontramos que la mayor eficiencia antioxidante lo presentó la cáscara del frijol chaucha IC_{50} 0,0078 mg/mL y el menor correspondió al mismo frijol pero al cotiledón IC_{50} 1,890 \pm 0,02 mg/mL, esta diferencia lo explican AMAROWICZ *et al.* (2009) quienes indican que el efecto antiradical y antioxidante depende de la fracción analizada tal como la cáscara

o toda la semilla.

Cuadro 9. Resultados del coeficiente de Inhibición IC_{50} (radical peroxilo) en dos especies de frijol.

Frijol	Partes	Tratamiento	IC_{50} (mg/mL)
palo	cotiledón	MP	$1,642 \pm 0,02^c$
	casaca	CP	$0,891 \pm 0,01^b$
chaucha	cotiledón	MC	$1,890 \pm 0,02^d$
	casaca	CC	$0,0078 \pm 0,00^a$

Los valores representan el promedio \pm SEM Los valores en una misma columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

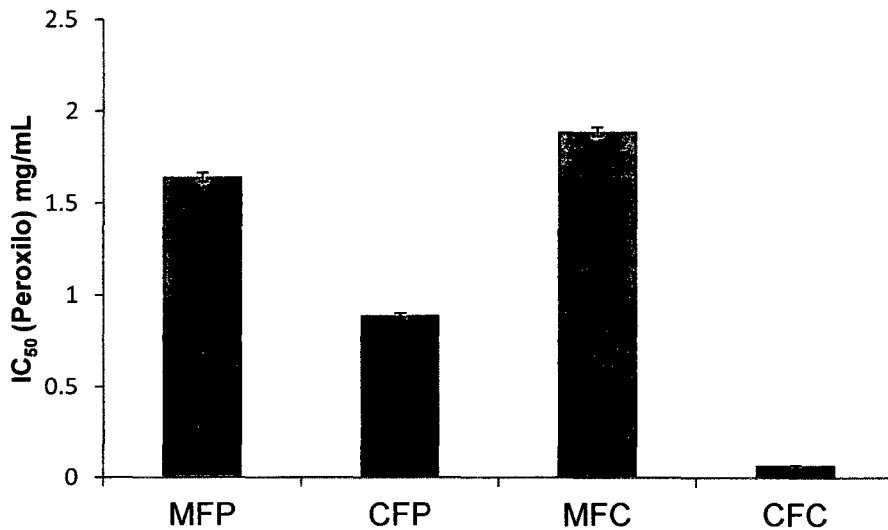


Figura 17. Comparación del coeficiente de inhibición IC_{50} del radical peroxilo.

Con respecto a los resultados del Cuadro 9 y Figura 17 podemos indicar que entre los frijoles existió una diferencia marcada tanto en el frijol de palo y chaucha según BOATENG *et al.* (2007) indican que el total de flavonoides en frijoles crudos fue 0,614 mgCE/g en frijol pinto y 0,845 mgCE/g

en frijol negro, los altos niveles de flavonoides puede ser debido al alto contenido de antocianinas. Asimismo HOSFIELD (2000) indica que el color de los frijoles permite codificar los genes responsables y determinar sus funciones bioquímicas. Por otro lado en el trabajo de TSUDA *et al.* (1994), estableció la actividad antioxidante de las semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* L blanco, rojo, y negro y encontró que la cáscara de la semilla y germen de las variedades blancas no tuvieron actividad en contraste a la cáscara de semilla rojo y negro que tuvieron buena actividad antioxidante. De igual modo Los flavonoides conocidos por su efectiva capacidad de capturar radicales libres como *Phaseolus vulgaris* L, se encontró taninos condensados e hidrolizados de alto peso molecular que han mostrado ser antioxidantes efectivos incluso con mayor actividad que los polifenoles.

Cuando se determina la actividad antioxidante se recomienda que se realice por lo menos con dos métodos diferentes tal como se ejecutó en este trabajo (DPPH y peroxilo), al respecto BOATENG *et al.*(2007) indican que el FRAP y DPPH en la evaluación de frijoles negros (kidney y pinto) comparado a los claros (blanco) tienen una alta cantidad de compuestos fenólicos y contribuyen al alto potencial antioxidante frente al valor de FRAP. Asimismo, el alto contenido de taninos condensados o proantocianinas presentados en frijoles oscuros más que en claros serían los responsables de tener una mayor actividad antioxidante. TEOW *et al.* (2006) indican que para evaluar la actividad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos es necesario aplicar varios métodos y los más comunes son DPPH y ABTS 2,2-azinobis (3-etilbenzo tiazoline-6-ácido sulfónico), el mecanismo de ambos es similar, ya que trabaja

en la absorción espectral, sin embargo existe diferencia especialmente del color cuando la muestra contiene antocianinas lo que afecta para determinar la actividad antioxidante.

En otros productos se han reportado valores de coeficiente de inhibición frente al radical peroxilo tales como la hoja de coca IC_{50} desde 23 a 26 $\mu\text{g/mL}$ BENITO (2009). Así como en noni maduro SULLON (2009) reportó IC_{50} 186,96 $\mu\text{g/mL}$ y DIAZ (2010) en tres ecotipos de guayaba maduro IC_{50} 0,881mg/mL en blanco, 1,228 mg/mL rojo y 0,576 mg/mL en rosado.

V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en la cáscara del frijol chaucha $2747,8 \pm 52,849$ mg AEG/100g y el menor contenido corresponde al cotiledón del mismo frijol $24,176 \pm 0,743$ g AEG/100g.
- El mayor contenido de quercetina lo presentó la cáscara de frijol chaucha $159,7 \pm 9,006$ mg quercetina/100g y el menor contenido lo presentó el cotiledón de frijol palo $2,087 \pm 0,148$ mg quercetina/100g.
- La mayor eficiencia de actividad antioxidante frente al radical DPPH y peroxilo lo presentó la cáscara de frijol chaucha $IC_{50} 0,0319$ mg/mL y $IC_{50} 0,0078$ mg/mL respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Caracterizar los componentes polifenólicos de las cáscaras de los frijoles *Phaseolus vulgaris* L. y *Cajanus cajan* L: y otras especies nativas.
- Evaluar la actividad antioxidante y contenido de antocianinas en diferentes genotipos coloreados de frijol que crecen en la zona del Alto Huallaga y en diferentes extractos.
- Evaluar la actividad antioxidante y la estabilidad de las antocianinas durante el almacenamiento de frijoles oscuros y pintos.
- Evaluar la actividad antioxidante por otros métodos FRAP, ORAC y para establecer su grado de correlación en diferentes genotipos de frijol.
- Evaluar los componentes bioactivos en otras partes de la planta de frijol como por ejemplo las hojas tiernas y maduras.
- Evaluar el efecto del procesamiento (cocido, tostado y otros) en el contenido de antioxidante de algunas variedades de frijoles.

VII. ABSTRACT

Beans are good sources of fiber and protein; however, these commodities are receiving attention because of their potential nutraceutical value as sources of secondary metabolites that may help alleviate chronic and degenerative diseases. The protective effect of beans is associated with its content of compounds such as phytoalexins and among them quercetin, which has been reported to show ant mutagenic properties and prevents the formation of free radicals, which in excess are deleterious to biological molecules. In the Upper Amazon region of Peru, specifically Tingo Maria, there are extensive areas of underutilized soils where native beans are grown for food purposes. However, their biological value has not been investigated fully. This study was conducted to evaluate the antioxidant activity and quantify the quercetin content of two native beans *Cajanus cajan* L. (frijol palo) and *Phaseolus vulgaris* L. (chaucha) that are part of the food staple of the locals. The investigation was carried out at the Center for Research on Amazonian Natural Products (CIPNA) and Biotechnology Laboratory of the National Agrarian University of the Jungle (UNAS). Tingo Maria is located in the Rupa Rupa District, Leoncio Prado Province and Huánuco Region of Peru. Quantification of total polyphenols was performed using the Folin-Ciocalteu method, quercetin content was determined by the method described by TOKUSOGLU *et al.*, 2003, antioxidant activity

assessed by inhibition of DPPH described by BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995 and peroxy radicals using the ABTS method. All analyses were performed using a Genesys 6, UV spectrophotometer. Statistical analysis were carried out using a complete randomized design and post-analysis were conducted if $P < 0.05$ using the Tuckey test (InStat Graphic). Results for polyphenol content (GAE mg/100g) were: chaucha coating 2747.8 ± 52.8 > frijol palo coating 54.72 ± 0.2 > frijol palo cotyledon 38.49 ± 0.5 > chaucha cotyledon 24.18 ± 0.7 . The concentration of quercetin (mg/100g) was: chaucha coating 159.7 ± 9.0 , frijol palo coating 4.29 ± 0.3 , chaucha cotyledon 2.71 ± 0.2 and frijol palo cotyledon 2.09 ± 0.1 , respectively. The IC_{50} (mg/mL) for DPPH inhibition were: chaucha coating 0.032, frijol palo coating 6.3, chaucha cotyledons 20.6 and frijol palo cotyledon 21.6, respectively. The IC_{50} (mg/mL) for inhibition of peroxy radicals were: chaucha coating 0.0078, frijol palo coating 0.89, chaucha cotyledon 1.89 and frijol palo cotyledon 1.64, respectively.

KEYWORDS: *Cajanus cajan* L., *Phaseolus vulgaris* L., quantification, polyphenols, quercetin, antioxidant activity, Perú.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMAROWICZ, R., ESTRELLA, I., HERNANDEZ, T., DUEÑAS, M., TROSZYNSKA, A., KOSIUSKA, A.; PEGG, R. 2009. Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 10:5513-5527.
- AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 464. Chilell Seminario. 161-172.
- BADUI, S. 1988. *Diccionario de tecnología de los alimentos*. México, Alhambra, S:A. 300p.
- BEJARANO, E., BRAVO, M., HUAMAN, M., HUAPAYA, M., ROCA, A., ROJAS, E. 2002. *Tabla de composición de alimentos industrializados*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Lima.
- BENITEZ, D.E. 2006. Vitaminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Cuba, Rev Cubana Invest Biomed.* 25(2).
- BENITO, M. 2009. *Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de la hoja de coca (Erythroxylum coca Lamarckvar. Coca) en tres desarrollos fisiológicos*. Tesis Ing. en Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

- BOATENG, J., VERGHESE, M., WALKER, L.Y., OGUTU, S. 2007. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus vulgaris* spp. L.).USA, Food Science Thecnology. 41:1541-1547.
- BRUNO, A. 1990. Leguminosas alimenticias; valor nutricional. Lima, Perú. Fraelé, S.A. p.127-129.
- CASSERES, E. 1970. Producción de hortalizas; origen de las leguminosas. México, Herrero hermanos Sucesores. 206p.
- CEDANO, J. 2006. Guía Técnica Cultivo del Guandul. Santo Domingo, República Dominicana, CEDAF. 84p.
- CHIAPPE, L. 1970. Cultivos alimenticios; Leguminosas. Lima, Perú. UNALM. 300p.
- CHOU, S.T., CHAO, W.W., CHUNG, Y.C. 2003. Antioxidant activity and safety of 50% ethanolic red beans extract (*Phaseolus vulgaris*L.var, aurea).J. Food Sci. 68:21-25.
- CHYAU, C., CHARNG, C., TSAI, SHU-YAO, KO, PEI-TZU, MAU, JENG-LEUN. 2002. Antioxidant propieties of solvent extract from *Terminalia catappa* leaves. Taiwan, Food Chemistry.78: 483-488.
- CLARKSON, P. Y THOMPSON, H. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. USA, Am.J Clin.Nutr. 72(suppl):637-46.
- CRESPY, V., MORAND, C., BESSON, C., MANACH, C., DEMIGNE, C., REMESY, R. 2001. Comparison of the intestinal absortion of quercetina, phloretin and their glicósidos in rats. France, J. Nutr. 131: 2109-2114.
- CUBERO, J.J. Y MORENO, M.T. 1983. Leguminosas de grano; características de las leguminosas. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. p. 213-231.

- DIAZ, M.G. 2010. Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) fresca y tratada térmicamente. Tesis Ing. en Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- DOSS, A., PUGALENTI, M., RAJENDRAKUMARAN, D., VADIVEL, V. 2010. Phenols, Flavonoids and Antioxidant Activity of underutilized legume seeds. India, Asian J. Exp. Biol. Sci. Vol. 1(3): 700-705.
- ELVIR, J. 1994. Radicales libres, Alcoholismo y Daño hepático. Venezuela, Dpto. de Fisiología, UNAH. p 76-81.
- GALVEZ-RANILLA, L.; GENOVESE, M.; LAJOLO, F. 2007. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.), Brasil, J. Agric. Food Chem. 55(1), pp 90-98.
- GARCIA, L., ROJO, M., SANCHEZ, E., GARCIA V. 2001. Plantas con Propiedades antioxidantes. Cuba, Rev. Cubana de Investigación, Instituto Superior de Ciencias Básicas y Pre clínicas "Victoria de Girón" Biomédica. 20(3):231-5.
- GONZALES-TORRES, M., BETACOURT-RULE, M., ORTIZ-MUÑIZ, R. 2000. Bioquímica, Daño Oxidativo y Antioxidantes. México, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 25(1): 3-9p.
- GUPTA, V., KUMRIA, R., GARG, M., GUPTA, M. 2010. Recent Updates on free Radicals scavenging Flavonoids: An Overview. India, Asian Journal of plant Sciences. 9(3):108-117.

- HALL III, C. (s/d). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. USA, North Dakota State University.
- HEIMLER, D., VIGNOLINI, P., DINI, M.G., ROMANI, A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. Italy, J. Agric. Food Chem. Vol. 53(8):3053-3056.
- HERNANDEZ, A. M. y GONZALEZ, E. A. 1999. Plantas que contienen polifenoles; antioxidantes dentro de estilo de vida. Habana, Cuba. Centro de Investigaciones.
- HERNANDEZ, R., FERNANDEZ, C., BAPTISTA, L. 2001. Metodología de la investigación. México, Edit. McGraw-Hill Interamericana de editores, S:A. 503p.
- HICKS, J.J., TORRES-RAMOS, Y., SIERRA-VARGAS, M. 2006. Estrés oxidante; concepto y clasificación. México, Rev. Endocrinología y Nutrición. Vol. 14 N° 4.pp 223-226.
- HOSFIELD, G. 2000. Seed coat in *Phaseolus vulgaris* L.: its chemistry and associated health related benefits.USA, Department of Crop and Soil Sciences, Michigan state University. MI 48824-1325.
- JANASZENSKA, M., BARTOSZ, A. 2002. Assayof Total Antioxidant Capacity: Comparison of four Methods as Applied to Human Plasma.Poland, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 62:23-236.
- KIM, D.O., CHUN, O. K., KIM, Y. J., MOON, H. Y., LEE, C. Y. 2003. Quantification of polyphenolies and their antioxidant capacity in fresh plums. J. of Agric. Food Chem. Vol. 51(25):7292-7295.

- KONG, Y.,FU, Y.J., ZU, Y.G., LIU, W., WANG, W.; HUA, X.; YANG, M. 2009. Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajaninstilbene acid and pinostrobin from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. Leaves. China, Food Chemistry. Vol. 117 (1): 152-159.
- KUSKOSKI, E., ASUERO, A., GARCIA-PARRILLA, C., TRONCOSO, A., FETT, R. 2004. Actividad Antioxidante de pigmentos antocianogénicos. Campiñas, Cienc. Tecnol. Aliment. 24(4):691-693.
- LEON, R., ANGULO, I., JARAMILLO, M., REQUENA, F. y CALABRESE, H. 1993. Caracterización química y valor nutricional de granos de leguminosas tropicales para la alimentación de aves. Maracaibo, Venezuela, Rev. Zootecnia Tropical. Vol. 11(2):151-170.
- LOPEZ, M. Y BRASSANI, R. 2008. Uso del cowpea (*Vigna unguiculata*) en mezclas con frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Guatemala, Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 58(1):5-15.
- MAKRIS, D.P., ROSSITER, J.T. 2001. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. London, England. Food Chemistry. Vol. 77: 177-185.
- MANDUJANO, B.J. 2008. Evaluación de nueve densidades de siembra en el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Chaucha en Tingo María. Tesis Ing.Agrónomo. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

- MASUM, G. M., KHANDAKER, L., BERTHOLD, J., GATES, L., PETERS, K., DELONG, H., HOSSAIN, K. 2011. Anthocyanin, Total Polyphenolics and Antioxidant Activity of Common Bean. USA, Mayville State University, ND. Am. J Food Technol. Vol. 6(5):385-394.
- MONROY, V., TOTOSAUS, A., GARCIA, M. 2004. Extracción de Polifenoles de Chile ancho y romero a diferentes concentraciones de etanol: agua. Tecnología de estudios Superiores de Ecotepec. Estado de México. Email dr_igm@yahoo.com.mx.
- MURRAY, R. 1969. Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Colombia. Edit. McGraw-Hill de México. 241 p.
- NTPTECHNICAL REPORT. 1992. Toxicology and carcinogenesis studies of quercetina in F344/N rats. U.S.A. Departament of Health and Human Services, National Institutes of Health. NIH Publication N° 92-3140.
- OBOH, G. 2006. Antioxidant proprieties of some commonly consumed and underutilized tropical legumes. Nigeria. Eur. Food Res. Technol. Vol. 224: 61-65.
- OCHO-ANIN, A.L., KOUAKOU, H., BROU, K.D. 2010. Evaluation of bioactive components in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (fabaceae) cultivated in Cote d'Ivoire. Francia. J. Appl. Biosci. Vol. 31: 1928-1934.
- OLIDEN, C.A. 1995. Influencia de la labranza manual y manejo de rastrojo en el rendimiento del frijol de palo (*Cajanus cajan* L.) Millsp. de crecimiento determinado en Tingo María. Tesis Ing. Agrónomo. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

- OOMAH, B.D., CORB, A.L., BALASUBRAMANIAN, P. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. Canada. J. Agric. Food Chem. Vol. 58(14), pp 8224-8230.
- REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS –GOMEZ, M.; LORCA-PINA, G. 2006. Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). México, Reseach Signpost, Universidad Autónoma de Queretaro. 217-236 ISBN: 81-7736-269-0.
- ROCHA-GUZMAN, N.E., GALLEGOS, J.A., GONZALEZ, L., PREZA, A.M., LERMA, Y., IBARRA, F.J. 2007. Antioxidant Activity in Cotyledon of black and Yellow Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Mexico, Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2(2): 112-117.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ZHANG, X., CONDEZO, L., LAO, J., ANGELES, F., MUSAH, R., BOBROWSKI, P., MILLER, M. 2001. Antiinflammatory and antioxidant activities of cats claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. Phytomedicine. Vol. 9:325-337.
- SREERAMULU, D., KUMAR, C.V., Y RAGHUNATH, M. 2009. Antioxidant activity of commonly consumed cereals, millets, pulses and legumes in India. India. J. of Biochem. And Biophysics. Vol. 46, pp. 112-115.
- SULLON, J. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante. Tesis Ing. en Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- TAMARO, D. 1981. Manual de horticultura; fisiología del frijol. México D.F. Ediciones McGraw-Hill S.A. 315p.

- TEOW, C., TRUONG, V.D., McFEETERS, R., THOMPSON, R., PECOTA, K., YENCHO, G.C. 2006. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. USA. Food Chemistry. 103:829-838.
- TOKUSOGLU, O., UNAL, M., YILDIRIM, Z. 2003. HPLC-UV and GC-MS Characterization of the Flavonol Aglycons Quercetin, Kaempferol and Myricitin in Tomato pastes and other Tomato-Based Products. Turkey. Acta Chromatographica N° 13.
- TSUDA, T., OSAKA T., ONSHIMA, K., KAWAKISHI, S. 1994. Antioxidants pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. J. Agric. Food Chem. Vol. 42(2):248-251.
- VARGAS-ALVAREZ, D., SOTO-HERNANDEZ, M., GONZALEZ-HERNANDEZ, V., EUGLEMAN, M., MARTINEZ-GARZA, A. 2004. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides de guayaba (*Psidium guajava* L.). México. Publicado como ARTICULO en Agrociencia. Vol. 40:109-115.
- VENEREO, J. 2001. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Cuba. Revista Cubana de Medicina Militar, Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Vol. 31(2):126-33.
- VICENTINI, F., GEORGETTI, S. JABOR, J., CARIS, J., BERTLEY, V., FONSECA, M. 2007. Photoestability of Quercetin Under Exposure to UV Irradiation. Brasil. Lat. Am. J Pharm. Vol. 26(6):119-24.
- WICZKOWSKI, W., ROMASZKO, J., BUCINSKI, A., SZAWARA-NOWAK, D., HONKE, J., ZIELINSKI, H., PISKULA, M. 2008. Quercetin from Shallots

(*Allium cepa* L. var. *Aggregatum*) is more Bioavailable Than its Glucosides¹⁻³. Poland. J Nutr. Vol.138: 885-888.

WU N., KUANG F.,FU Y.J.,ZU Y. G.,CHANG F. R.,CHEN Y. H.,LIU X. L., YU K., WEI L.,GU C. B. 2009. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. Leaves. China. Molecules. Vol. 14:1032-1043.

XU, B. Y CHANG, S. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. USA. J. Agric. Food Chem.Vol. 57(11):4754-4764.

ZHI, Y., Y HOWARD, L.R. 2005. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin..S.A. J. Food Science. Vol. 70, n° 4.

IX. ANEXOS

Anexo A: Cuantificación de polifenoles totales en frijoles

Cuadro 10. Resultados de la curva estándar de polifenoles totales.

Repeticiones	Concentraciones (mg AG/mL)					
	1,5	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
1	1,837	1,289	0,611	0,303	0,151	0,071
2	1,774	1,213	0,613	0,303	0,144	0,077
3	1,756	1,028	0,599	0,302	0,133	0,081
Promedio	1,789	1,177	0,608	0,303	0,143	0,076

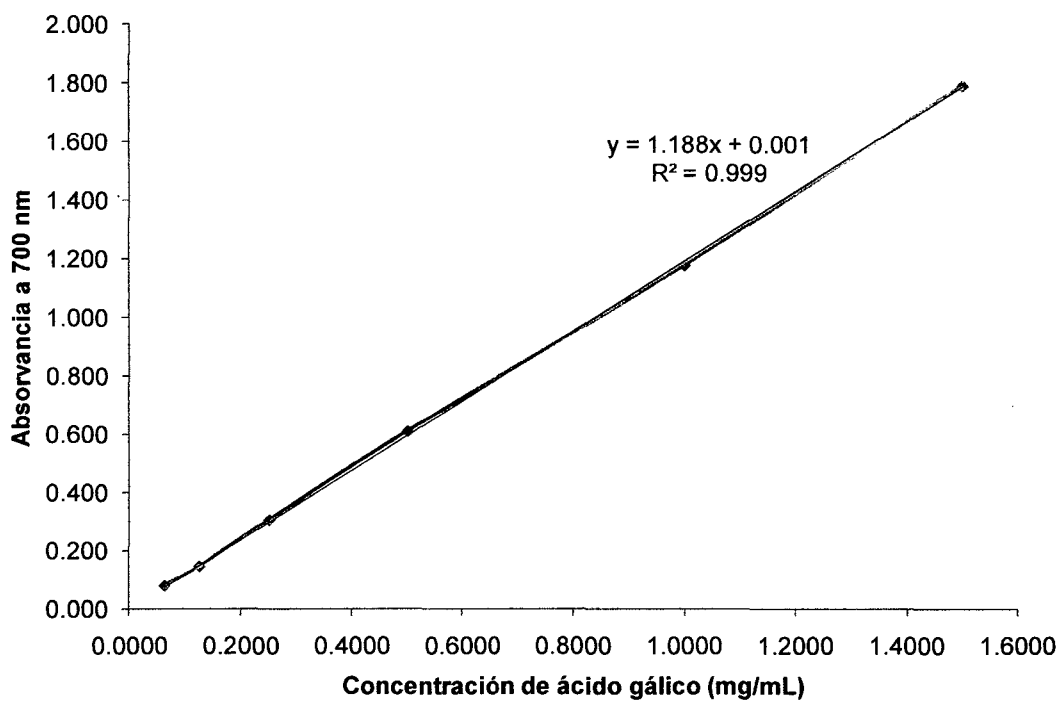


Figura 18. Curva estándar para la cuantificación de polifenoles totales.

Cuadro 11. Análisis de variancia del contenido de polifenoles totales en cáscara y cotiledón de dos especies de frijol.

FV	GL	SC	CM	F	sig
Tratamiento	3	27,5100	9171553	2626,2	**
Error	16	55877	3492,3		
Total	19	27,5658			

Anexo B: Cuantificación de quercetina en frijoles

Cuadro 12. Análisis de variancia para el contenido de quercetina.

FV	GL	SC	CM	F	Sig
Tratamiento	3	55,200.00	18404	301,91	***
Error	8	487,67	60,959		
Total	11	55,687.67			

Anexo C: Evaluación de la actividad antioxidante en frijoles (radical DPPH y radical peroxilo).

Cuadro 13. Preparación de soluciones intermedias para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de frijol por radical DPPH.

concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Solución stock (μL)	Etanol (μL)	Volumen (μL)
600	30	970	1000
2000	100	900	1000
6000	300	700	1000
20000	1000	0	1000

Cuadro 14. Análisis de varianza del extracto etanólico de las especies de frijol y partes del grano frente al radical DPPH.

FV	GL	SC	CM	F	Sig
Tratamiento	3	3089,2	1029,7	4719	**
Error	32	6,983	0,2182		
Total	35	3096,2			

Cuadro 15. Preparación de soluciones intermedias para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de frijol por el radical peroxilo.

Solución de trabajo ($\mu\text{g/mL}$)	Solución stock (μL)	Etanol (μL)	Volumen Final (μL)
120	30	970	1000
400	100	900	1000
1200	300	700	1000
4000	1000	0	1000

Cuadro 16. Análisis de varianza del extracto etanólico de las especies de frijol y partes del grano frente al radical peroxilo.

FV	GL	SC	CM	F	Sig
Tratamiento	3	19,38	6,46	2195,3	**
Error	32	0,0942	0,002943		
Total	35	19,474			

X. GLOSARIO

Antivitamina, compuestos que reducen el aprovechamiento de las vitaminas de los alimentos.

Fitoalexina, se conoce con este término a todas las sustancias formadas como metabolitos secundarios.

Flavonoide, grupo de más de 800 pigmentos vegetales amarillos, hidrosolubles, más estables al calor y al pH que las antocianinas, sus derivados salinos son de color más intenso, entre los principales se encuentran los flavonoles y flavonas.

Flavonol, (3-hidroxi-flavona) $C_{15}H_{10}O_3$, color amarillo que corresponde a una flavona con un OH en posición 3, lo cual le confiere propiedades únicas que no tienen las flavonas simples.

Proantocianidinas, grupo de compuestos incoloros en diversas frutas cuya transformación química durante el procesamiento de los alimentos produce una antocianidina coloreada, su estructura básica la compone el flavan 3,4-diol en forma monomérica o bien como dímero o trímero.

Quercetina, $C_{15}H_{10}O_7$, flavonol que se encuentra como aglucón de quercitrina, la rutina y otros flavonoides, corresponden a la forma de la luteolina.

Sonicar, es la operación por el cual se emiten ondas magnéticas a través de un medio de transporte que puede ser agua o aire y que sirve para liberar las moléculas de oxígeno atrapados en las células.

Taninos condensados, están formados por moléculas de catequina de Proantocianidinas y semejantes, no tienen naturaleza de ésteres hidrolizables sino que sus núcleos están unidos por ligaduras entre átomos de C.