



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



“Evaluación del rendimiento, estabilidad y potencial biológico de un extracto rico en antocianinas del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L. var. San Luis) obtenido a través de extracción supercrítica y presurizada”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica opción terminal
en Biotecnología Agroalimentaria

PRESENTA

Q.F.B. Ming Hsieh Lo

Director: Dr. Luis Alfonso Mojica Contreras
Co-director: Dr. Gustavo Adolfo Castillo Herrera
Co-directora: Dra. Cecilia Guízar González

Guadalajara, Jalisco. Noviembre 2019.

JUNTA DIRECTIVA

10-12-19



Guadalajara, Jalisco a 22 de noviembre de 2019

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Ming Hsieh Lo**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “Evaluación del rendimiento, estabilidad y potencial biológico de un extracto rico en antocianinas del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L. var. San Luis) obtenido a través de extracción supercrítica y presurizada” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 22 del mes de noviembre del año dos mil diecinueve.



Dr. Luis Alfonso Mojica Contreras

Director de tesis



Dr. Gustavo Adolfo Castillo Herrera

Co-director de tesis



Dra. Cecilia Guízar González

Co-director de tesis

DEDICATORIA

Dedico de manera especial a mi padre Lo Cheo Kun, a mi madre Hsieh Wen Hui y a mi hermano Lo Felipe por apoyarme continuamente y brindándome comprensión y cariño.

A mis compañeros, amigos y mentores, por sus valiosos consejos y que sin esperar nada a cambio me compartieron sus conocimientos.

A Melissa Rubi De Alba Mendoza por estar presente en todo momento a mi lado, por darme tu apoyo y motivación para superarme cada día más. Gracias por tu cariño y amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera sincera y de corazón, al Dr. Luis Alfonso Mojica Contreras por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo, paciencia y dedicación han sido invaluable en el desarrollo de esta tesis. Le agradezco haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo todos los objetivos establecidos en este proyecto. Muchísimas gracias.

Gracias a mis co-directores, el doctor Gustavo Adolfo Castillo Herrera y la doctora Cecilia Guízar González, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir sus amplios conocimientos. Fue un privilegio contar con su guía, les agradezco plenamente el haberme brindado esta oportunidad de trabajar con ustedes.

Para mis amigos de grupo, quienes han sido excelentes compañeros de trabajo. Gracias a Alex Escobedo, quien fue un amigo siempre generoso y dispuesto como pocos, que compartió consejos y conocimientos de gran valor. Gracias a Arturo, Brenda, Samantha, Rafael, Víctor, Jonathan y David, con quienes la conversación más ligera te deja algo provechoso. Muchas gracias por su apoyo.

Para aquellos amigos que han compartido conmigo los momentos difíciles. Gracias a Azucena Herrera, quien siempre tiene consejos y comentarios para enriquecer el trabajo. Gracias a Anahí Martínez y Mariana Pineda por las pláticas de carácter científico y personal, generalmente improvisadas, las cuales fueron altamente enriquecedoras en los dos ámbitos. Gracias a Cecilia Moreno y Mario Ochoa quienes,

con su carisma, colaboración y consejos, contribuyeron de manera especial y de gran valor a mi crecimiento profesional y personal. Sin el apoyo de todos ustedes habría sido más complicado llevar a cabo este trabajo.

Finalmente, debo agradecer al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ) por haberme facilitado sus instalaciones, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por haber financiado mis estudios otorgándome la beca nacional número 846044. También agradezco al proyecto CONACyT-Problemas nacionales 2016 número 2081 por el financiamiento de esta tesis.

I. INDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
3.1.1 Composición del frijol común	4
3.2 Compuestos fenólicos.....	7
3.3 Antocianinas	8
3.3.1 Solubilidad de las antocianinas.....	9
3.3.2 Coloración.....	10
3.3.3 Potencial biológico de las antocianinas	10
3.3.3.1 Diabetes Mellitus.....	10
3.3.3.2 α -amilasa y la α -glucosidasa.....	11
3.3.3.3 Dipeptidil peptidasa-IV	12
3.3.3.4 Estrés oxidativo.....	13
3.3.4 Estabilidad	16
3.3.4.1 Influencia del pH	16
3.3.4.2 Efecto de la temperatura.....	17
3.3.4.3 Oxígeno	17
3.3.4.4 Enzimas	18
3.3.5 Co-pigmentación.....	18
3.4 Métodos de extracción.....	21
3.4.1 Lixiviación	22
3.4.2 Extracción con líquidos presurizados (PLE)	23
3.4.3 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	24
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
6.1 Objetivo general.....	29
6.2 Objetivos específicos	29
7. METODOLOGÍA.....	30

7.1 Materiales	30
7.2 Método de descascarillado del frijol	30
7.3 Extracción por lixiviación (LEA)	31
7.4 Extracción por líquidos presurizados (PLE)	31
7.5 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	31
7.6 Identificación de antocianinas por UHPLC.....	32
7.7 Identificación de compuestos fenólicos no coloreados por UPLC-ESI-QToF- MS/MS	32
7.8 Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC) y antocianinas totales	33
7.9 Evaluación de la estabilidad de antocianinas y su color	34
7.10 Medición del color	34
7.11 Cinética de reacción de antocianinas	34
7.12 Inhibición de α -amilasa y la α -glucosidasa	35
7.13 Inhibición de dipeptidil peptidasa-IV	36
7.14 Capacidad antioxidante	36
7.15 Diseño experimental y análisis estadístico	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1 Comparación de los métodos de descascarillado a través de la lixiviación	38
8.2 Extracción de antocianinas con líquidos presurizados y fluidos supercríticos .	39
8.3 Comparación entre métodos de extracción convencionales y alternativos.....	44
8.4 Antocianinas del frijol negro variedad San Luis	45
8.5 Compuestos fenólicos no coloreados en el frijol común variedad San Luis.....	47
8.6 Estabilidad de los extractos ricos en antocianinas.....	48
8.6.1 Efecto de la exposición a la luz.....	48
8.6.2 Efecto del almacenamiento.....	51
8.7 Potencial biológico de los extractos ricos en antocianinas	56
8.7.1 Potencial antidiabético	56
8.7.2 Potencial antioxidante.....	59
9. CONCLUSIÓN	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. BIBLIOGRAFÍA	63

II. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Comparación del contenido de antocianinas entre algunas variedades del frijol común	7
Tabla 2. Principales antocianinas presentes en el frijol negro	9
Tabla 3. Matriz de diseño experimental D-optimal para la extracción con líquidos presurizados	41
Tabla 4. Matriz de diseño experimental D-optimal para la extracción con fluido supercrítico	43
Tabla 5. Antocianinas y compuestos fenólicos totales a partir de diferentes métodos de extracción	45
Tabla 6. Tabla comparativa entre el método de extracción convencional y alternativa	46
Tabla 7. Análisis cualitativo de los extractos obtenido por diferentes métodos	48
Tabla 8. Efecto de la luz sobre los extractos ricos en antocianinas. Tasa de degradación y tiempo de vida media de las antocianinas en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días	49
Tabla 9. Cinética de reacción de primer orden para compuestos fenólicos totales (A) y color a* (B) de extractos en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días..	50
Tabla 10. Efecto de la luz sobre los extractos ricos en antocianinas. Cambio en los parámetros de color (L*, a* y b*) de las antocianinas en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días	50
Tabla 11. Efecto del almacenamiento sobre los extractos ricos en antocianinas. Tasa de degradación, tiempo de vida media y energía de activación de las antocianinas a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas.....	53
Tabla 12. Cinética de reacción de primer orden y parámetros de Arrhenius para compuestos fenólicos totales (A) y color a* (B) de extractos a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas	54
Tabla 13. Efecto del almacenamiento sobre los extractos ricos en antocianinas. Cambios en los parámetros de color (L*, a* y b*) de las antocianinas a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas	55

Figura 1. Partes de un frijol.....	5
Figura 2. Partes de un frijol germinado, diferenciándose el tallo superior e inferior ...	5
Figura 3. Principales componentes presentes en las tres partes básicas del frijol: (A) cotiledón, (B) cascarilla y (C) hilo	6
Figura 4. Estructura general y sustituyentes para las principales antocianidinas presentes en el frijol común.....	9
Figura 5. Mecanismo de acción de las enzimas (A) α -amilasa y (B) α -glucosidasa .	11
Figura 6. Rol del DPP-IV, GLP-1 y GIP en la homeostasis de la glucosa	12
Figura 7. Diferentes rutas metabólicas en donde se muestra cómo la hiperglucemia contribuye al daño oxidativo	14
Figura 8. Las ROS producidos por diferentes rutas metabólicas contribuyen al aumento del estrés oxidativo provocando inflamación y resistencia a la insulina..	15
Figura 9. Diferentes formas químicas de la antocianina según el pH.....	17
Figura 10. Ejemplo de estabilización de las antocianinas por la formación del complejo de transferencia de carga (interacción de la antocianina con un compuesto fenólico)	19
Figura 11. Estabilización de las antocianinas a través de diferentes métodos de co-pigmentación	21
Figura 12. Extracción de compuestos a través de lixiviación.	22
Figura 13. Diagrama general del sistema de extracción con solventes altamente presurizados	24
Figura 14. Diagrama de fases del dióxido de carbono.	25
Figura 15. Diagrama general del sistema de extracción con fluidos supercríticos ...	26
Figura 16. Concentración de compuestos fenólicos totales (A) y antocianinas totales (B) de muestras sometidas a diferentes métodos de descascarillado	39
Figura 17. Gráficos de superficie de respuesta del modelo cuadrático para antocianinas (A) y polifenoles totales (B) obtenidos por SFE, y antocianinas (C) y polifenoles totales (D) recuperadas por PLE.	42
Figura 18. Cromatograma UHPLC representativo de los extractos de antocianinas y el porcentaje de área relativa (absorbancia a 520 nm). Los resultados se muestran en media \pm desviación estándar	47

Figura 19. Efecto de la exposición a la luz sobre la diferencia de color (ΔE^*) del extracto rico en antocianinas de LEA-M y SFE.....	51
Figura 20. Gráfico de Arrhenius de antocianinas a diferentes temperaturas para la extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente LEA-M (A) y la extracción con fluidos supercríticos SFE (B).....	52
Figura 21. Efecto del almacenamiento de temperatura sobre la diferencia de color (ΔE^*) del extracto rico en antocianinas de LEA-M y SFE	56
Figura 22. Potencial biológico del extracto rico en antocianinas recuperado a través diferentes métodos. Concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de α -amilasa (A), α -glucosidasa (B), DPP-IV (C), DPPH (D) y ABTS (E)	58

III. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ΔE *: diferencia de color, μL : microlitros, π : pi, %: porcentaje, $^{\circ}\text{C}$: grado Celsius, ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico, ANOVA: análisis de varianza, C3GE: equivalentes de cianidina-3-glucósido, CO_2 : dióxido de carbono, d: días, ADN: ácido desoxirribonucleico, DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPP-IV: dipeptidil peptidasa-IV, E_a : energía de activación, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, ESI: ionización por electrospray, EtOH: etanol, eV: electronvoltio, g: gramos, GAE: equivalentes de ácido gálico, GIP: polipéptido insulínico dependiente de glucosa, GLP-1: péptido similar al glucagón 1, GRAS: Generalmente reconocido como seguro, h: horas, H_2O : agua, IC_{50} : concentración inhibitoria semi-máxima, k: constante de velocidad de reacción, kV: kilovoltio, L^* : luminosidad, L: litros, LEA: lixiviación, LEA-M: extracción por lixiviación de cascarilla descascarillada manualmente, LEA-WB: extracción por lixiviación del frijol negro entero, m/z: relación masa/carga de iones, M: descascarillado manual, M1: método 1, M2, método 2, min: minutos, mL: mililitros, mM: milimolar, MS: espectrometría de masas, N: normalidad, NaCl: cloruro de sodio, Na_2CO_3 : carbonato de sodio, nm: nanómetros, PBS: buffer de fosfato de sodio, PLE: extracción con líquidos presurizados, Q_{10} : cambio en la constante de velocidad de reacción para 10°C , R^2 : Coeficiente de regresión, ROS: especies reactivas de oxígeno, RPM: revoluciones por minuto, SFE: extracción con fluidos supercríticos, $t_{1/2}$: tiempo de vida media, T2DM: diabetes mellitus tipo 2, TPC: compuestos fenólicos totales, Tris: tris(hidroximetil)aminometano, U: Unidades, UHPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución, UPLC-ESI-QToF-MS/MS: cromatografía líquida de ultra resolución-ionización por electrospray-cuadrupolo-tiempo de vuelo-espectrometría de masas, UV: ultravioleta, v: volumen, WB: Frijol negro triturado.

1. RESUMEN

El frijol negro es una fuente importante de antocianinas y otros compuestos fenólicos que están asociados con beneficios para la salud. Este trabajo tuvo como objetivo optimizar la extracción y determinar la estabilidad y el potencial biológico del extracto rico en antocianinas recuperado por extracción con fluido supercrítico (SFE) y extracción con líquido presurizado (PLE). Las condiciones de operación (co-solvente, temperatura y presión) se optimizaron mediante un diseño D-optimal. Se analizó la concentración de antocianinas, compuestos fenólicos totales y el potencial antioxidante y antidiabetes. Los perfiles químicos se analizaron a través de UPLC-ESI-QToF-MS/MS. La concentración más alta de antocianinas y compuestos fenólicos totales fue el extracto recuperado por SFE utilizando 300 bar, 60 ° C y como co-solvente etanol/agua al 50% v/v. Se identificaron once compuestos fenólicos no coloreados, de los cuales la miricetina, el ácido sirínico, el hidrato de rutina y el ácido clorogénico presentaron la intensidad relativa más alta entre los compuestos identificados. En comparación con la extracción por lixiviación, los extractos de SFE mostraron una estabilidad de almacenamiento estadísticamente similar a 4, 25 y 32°C ($p < 0.05$) pero con un mayor potencial antioxidante [DPPH IC_{50} : 0.078 ± 0.01 mg C3GE/g cascarilla; ABTS IC_{50} : 0.161 ± 0.03 mg C3GE/g cascarilla] y potencial antidiabetes [α -amilasa IC_{50} : 124.76 ± 12.97 mg C3GE/g cascarilla; α -glucosidasa IC_{50} : 31.30 ± 0.84 mg C3GE/g cascarilla; dipeptidil peptidasa-IV IC_{50} : 0.195 ± 0.01 mg C3GE/g cascarilla]. La extracción con fluidos supercríticos es un método eficiente para extraer antocianinas y otros compuestos fenólicos del frijol, incrementando su potencial biológico.

2. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más consumidas en todo el mundo. En el 2016, México produjo 1.08 millones de toneladas de frijol, el cual corresponde al 5.5% de la producción mundial (SAGARPA 2017). Es una fuente económica de proteínas, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, los cuales incluyen a las antocianinas (Mojica et al. 2015). Las antocianinas se encuentran principalmente en la cascarilla del frijol coloreado. Estos son flavonoides hidrosolubles constituidos por una antocianidina (anillo de flavilio), azúcares y, opcionalmente, grupos acilos (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017). Las antocianinas tienen potencial para ser utilizadas como colorantes alimentarios debido a sus atractivos colores azul/rojo y su no toxicidad. Además, estas moléculas están asociadas con posibles beneficios para la salud, pudiendo proporcionar efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antidiabetes (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017).

La diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) es un trastorno metabólico no transmisible que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia crónica debido a una producción inadecuada de insulina y defectos en la sensibilidad a la insulina (Gowd, Jia, y Chen 2017; Guo y Xia 2013). La hiperglucemia en la T2DM conduce a una sobreproducción de radicales libres, lo que resulta en un aumento del estrés oxidativo. La acumulación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) puede causar daños a las macromoléculas como el ADN, las proteínas, las membranas y provocar complicaciones graves como insuficiencia renal, disfunción hepática, ceguera, ataque cardíaco y daño a los nervios (Gowd, Jia, y Chen 2017).

Se ha sugerido que los efectos benéficos de las antocianinas se atribuyen a su capacidad para inhibir la formación de ROS y la actividad de enzimas hidrolizantes de carbohidratos como la α -amilasa y la α -glucosidasa, contribuyendo así en la prevención y el tratamiento de la T2DM (Aguilera et al. 2016; Gowd, Jia, y Chen 2017). Además, el control glucémico se puede mejorar por el potencial de las antocianinas para inhibir la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV), evitando así la degradación de las hormonas incretinas (May 2009). GIP (polipéptido insulínico dependiente de

glucosa) y GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) son hormonas incretinas con potencial terapéutico en pacientes con T2DM, ya que pueden aumentar la liberación de insulina y disminuir la liberación de glucógeno (Nauck y Meier 2018).

Sin embargo, las antocianinas son muy inestables y susceptibles a la degradación. En este sentido, su estabilidad se puede mejorar a través de la co-pigmentación, el cual es un ensamblaje supramolecular. Esta asociación no covalente se da entre una antocianina y un co-pigmento por interacciones intramoleculares o intermoleculares. Los co-pigmentos que más se utilizan son flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, aminoácidos y otras antocianinas (Aguilera et al. 2016; Trouillas et al. 2016). Por lo tanto, el uso de métodos de extracción eficientes podría aumentar significativamente la concentración de antocianinas y otros compuestos fenólicos, mejorando así el efecto de co-pigmentación.

La extracción con líquido presurizado (PLE) y la extracción con fluido supercrítico (SFE) son métodos alternativos a las extracciones convencionales de sólido-líquido, los cuales podrían reducir en gran medida la cantidad de solvente empleado y los tiempos de procesamiento de la muestra. PLE utiliza solvente líquido a alta temperatura y presión, proporcionando una mayor eficiencia de extracción debido a una mayor solubilidad y penetración de solvente en la matriz sólida (Espada-Bellido et al. 2018; Paes et al. 2014). Por otro lado, SFE utiliza dióxido de carbono por encima de su punto crítico, y podría aumentar el rendimiento de antocianinas y otros compuestos fenólicos del frijol debido a su capacidad para disolverse como un líquido y penetrar en la matriz como un gas (Babova et al. 2016).

A pesar de que se ha investigado la recuperación de extractos ricos en antocianinas de mora azul, saúco, arándano y otras fuentes a través de PLE y SFE, todavía no hay reportes de esas técnicas para la extracción de antocianinas del frijol negro. Por consiguiente, este trabajo tuvo como objetivo (I) optimizar la extracción de antocianinas del frijol negro utilizando las técnicas de PLE y SFE, y (II) evaluar la estabilidad y el potencial biológico de los extractos ricos en antocianinas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Hoy en día, el frijol común es uno de los alimentos básicos de mayor importancia en México, ocupando el segundo lugar después del maíz. Esta semilla proveniente de una leguminosa, la cual es una planta herbácea anual que tiene como nombre científico *Phaseolus vulgaris* L. El frijol puede ser de forma oblonga, oval o redondeada según la variedad, poco comprimidas y de diferentes colores, desde café, negro o hasta rojo, adicionalmente, están contenidos en el interior de una vaina, el cual está suavemente curvada o dehiscente (SAGARPA 2017).

El frijol es la leguminosa más consumida en México debido a su sabor, su precio accesible y por ser una importante fuente de proteínas, fibra, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos (SAGARPA 2017; Mojica et al. 2015). En el 2016, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reportó un consumo nacional 1.22 millones de toneladas (MMt), asimismo, México en ese mismo año produjo 1.08 MMt de frijol, aportando el 5.5 % de la producción mundial y, por consiguiente, posicionándolo como el cuarto productor (SAGARPA 2017).

3.1.1 Composición del frijol común

El frijol está compuesto principalmente por tres partes básicas: la cascarilla o testa, el cotiledón y el embrión. La cascarilla es el tegumento exterior que envuelve a la semilla proporcionándole una protección mecánica, usualmente es duro, coloreado y parcialmente impermeable al agua. Adicionalmente, el orificio presente en la cascarilla que permite la absorción de agua para la germinación, llamado micrópilo, es visible. El hilo suele ser visible también, es la cicatriz dejada por la separación del fruto dentro del cual se encontraba (Audesirk 2013).

En el frijol, los cotiledones son las primeras hojas de la planta, sin embargo, son considerados como falsas hojas debido a que son parte de la semilla. Estos tienen como función principal proporcionar nutrientes para el crecimiento del embrión hasta que sea capaz de realizar la fotosíntesis. Por otra parte, el embrión es la parte de la

semilla que crece convirtiéndose en una planta y está compuesto por la radícula (primeras raíces), plúmula (primeras hojas), el hipocótilo (espacio entre la radícula y los cotiledones, forma posteriormente el tallo inferior) y el epicótilo (espacio entre los cotiledones y la plúmula, formando el tallo superior) (Audesirk 2013; Campbell, N.A., & Reece 2008). Estos componentes morfológicos del frijol se pueden ver a detalle en la Figura 1 y 2.



Figura 1. Partes de un frijol.

(modificado de: <https://www.carlsonstockart.com/photo/pine-bean-seed-structure-comparison-gymnosperm-angiosperm/>)

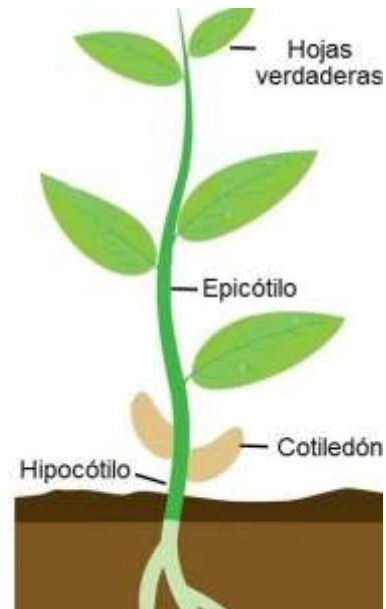


Figura 2. Partes de un frijol germinado,

diferenciándose el tallo superior e inferior (modificado de: <https://mx.depositphotos.com/19006725/stock-illustration-sequence-of-bean-seeds-germination.html>)

El cotiledón, al ser un almacén de nutrientes, contiene como principal carbohidrato de reserva energética el almidón y como la principal proteína de reserva globular la faseolina. Además de las macromoléculas mencionados anteriormente, puede tener también compuestos fenólicos, principalmente ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, los cuales pertenecen a la familia de ácidos fenólicos (Figura 3) (Quiceno, J., Ospina, L., David, D., Román, M., Betancur, M., Cadavid y Cardona, L., Muñoz L., Imbachí, P., Martínez, B., Passaro 2017; Chávez-Mendoza y Sánchez 2017).

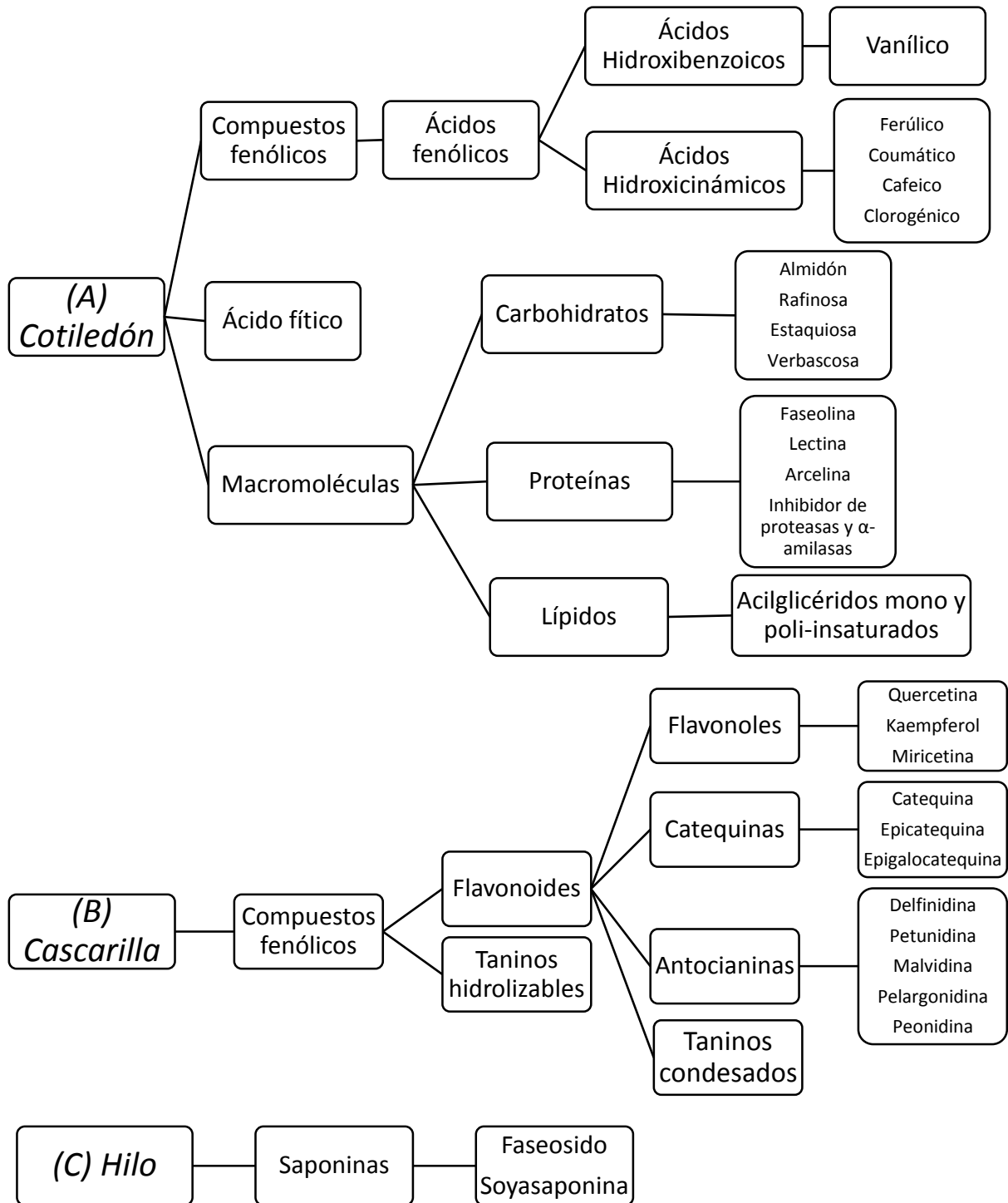


Figura 3. Principales componentes presentes en las tres partes básicas del frijol: (A) cotiledón, (B) cascarrilla e (C) hilo (Ganesan y Xu 2017; Luna-vital, Mojica, y Gonz 2014; Ranilla, Genovese, y Lajolo 2007; Guajardo-Flores et al. 2012; Ulloa et al. 2011).

Sin embargo, las antocianinas, catequinas, flavonoles y taninos, son los compuestos fenólicos de mayor importancia del frijol y están presentes principalmente en la cascarilla. Estos compuestos son los que determinan el color de la semilla y sus cantidades pueden variar según las condiciones de cultivo y los factores genéticos. Generalmente los tonos oscuros indican una mayor cantidad de los compuestos anteriormente mencionados, estos no sólo dan la coloración, si no también poseen actividades biológicas (Chávez-Mendoza y Sánchez 2017; Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017; Mojica et al. 2015).

Aunado a lo anterior, ha sido demostrado por diversos estudios que el frijol negro es el tipo que contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas (Tabla 1) (Mojica et al. 2015; Golam Masu et al. 2011).

Tabla 1. Comparación del contenido de antocianinas entre algunas variedades del frijol común (Mojica et al. 2015)

Color de la cascarilla del frijol	Verde con rosa-violeta (FJ-León)	Verde con rosa-violeta (FM-67)	Amarillo oscuro (BRS Horizonte)	Negro (Negro-Frijozac)	Negro (Negro-Otomí)
Contenido de antocianinas (mg/100 g cascarilla)	6.0±0.0	8.0±0.0	13.0±0.0	206.0±0.0	250.0±0.1

*FJ, Flor de Junio, FM: Flor de Mayo, BRS Horizonte: Horizonte Brasileño.

3.2 Compuestos fenólicos

Un compuesto fenólico es aquel compuesto orgánico que en su estructura química contiene al menos un grupo fenol, el cual es un anillo aromático unido al menos a un grupo hidroxilo (-OH). Los compuestos fenólicos de las plantas son metabolitos secundarios sintetizados ya sea por la vía del ácido shikímico/fenilpropanoide, por la vía de acetato/malonato utilizando policétidos, en el cual se producen fenoles simples o utilizando ambas rutas metabólicas (Weidner et al. 2018; Cheynier et al. 2013). Tienen como función principal ofrecer protección contra los insectos y microorganismos. Por otra parte, se ha reportado que el consumo de estos compuestos es benéfico a la salud, proporcionando un significativo efecto antioxidativo, anticancerígeno, antimutagénico y antiinflamatorio (Mojica et al. 2015). Además de

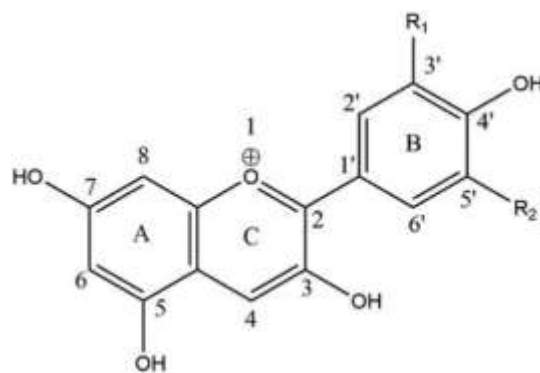
eso, hay evidencia que sugiere que el consumo de frijol puede disminuir el riesgo de cardiopatía isquémica, enfermedades cardiovasculares, cáncer de estómago y próstata, diabetes, obesidad, entre otras enfermedades (Ulloa et al. 2011; Aguirre y Gómez-Aldapa 2010; Messina 2014).

3.3 Antocianinas

Uno de los grupos de compuestos fenólicos con potencial biotecnológico en los frijoles son las antocianinas, los principales responsables de proporcionar color a la cascarilla de la semilla. Las antocianinas son pigmentos vacuolares, hidrosolubles y están formadas por dos o tres unidades químicas (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017; Zhao et al. 2018; Quiceno, J., Ospina, L., David, D., Román, M., Betancur, M., Cadavid y Cardona, L., Muñoz L., Imbachí, P., Martínez, B., Passaro 2017):

- I. Una base aglicona o un anillo flavylim (antocianidina), el tipo de molécula cambia según el grupo funcional unido en las posiciones 3' y 5' (Figura 4).
- II. Un azúcar se une en la posición 3 de la antocianidina y generalmente es glucosa, galactosa, arabinosa o ramnosa o puede estar unido un di o trisacárido formado a partir de los monosacáridos antes mencionados.
- III. Pueden estar unidos ácidos acilados, como el ácido cafeico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido ferúlico.

Asimismo, la estructura básica de la antocianidina es un anillo aromático A unido a un anillo heterocíclico C que contiene oxígeno, y el cual se une por enlaces C – C a un tercer anillo aromático B (Figura 4).



Antocianidina o aglicona	Substitución		λ_{max} (nm)
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Delfinidina	OH	OH	508
Petunidina	OCH ₃	OH	508
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510
Pelargonidina	H	H	494
Cianidina	OH	H	506

Figura 4. Estructura general y sustituyentes para las principales antocianidinas presentes en el frijol común (Quiceno, J., Ospina, L., David, D., Román, M., Betancur, M., Cadavid y Cardona, L., Muñoz L., Imbachí, P., Martínez, B., Passaro 2017; Zhao et al. 2018).

Las principales antocianinas presentes en el frijol negro son la delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido (Tabla 2).

Tabla 2. Principales antocianinas presentes en el frijol negro (Chávez-Mendoza y Sánchez 2017)

Antocianina	Porcentaje %
Delfinidina-3-glucósido	56
Petunidina-3-glucósido	26
Malvidina-3-glucósido	18

3.3.1 Solubilidad de las antocianinas

Las antocianinas son solubles en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, pero no son solubles en soluciones alcalinas o neutras. Las antocianidinas son más solubles en alcohol que las antocianinas, estos últimos son más solubles en agua por su parte glicosilada. Asimismo, en ambientes de pH bajo, la solubilidad de las antocianinas en el agua se incrementa por las protonaciones, sin embargo, esta solubilidad puede verse reducida cuando se incrementa el grado de acetilación de la molécula (Khoo et al. 2017).

3.3.2 Coloración

El color de las antocianinas es dependiente del pH y del número y orientación de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) y metoxilo ($-\text{OCH}_3$) de la molécula. A pH bajos, las antocianinas tienen un color rojo intenso y a medida que el pH aumenta la coloración pasa a ser más violeta. Además, moléculas con mayor grado de hidroxilación tienden a producir tonalidades azules, mientras que aquellos con mayor grado de metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón 2008). Por lo tanto, es una alternativa ideal para sustituir los colorantes sintéticos empleados en la industria alimentaria.

3.3.3 Potencial biológico de las antocianinas

Las antocianinas tienen propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas ya que puede inhibir las citoquinas pro-inflamatorias, decrementar su producción y previene la disfunción de las células beta, los responsables de la síntesis y segregación de la insulina (Mojica et al. 2015). Por esa razón, las antocianinas podrían ser utilizados como una estrategia con potencial para el control de la diabetes mellitus.

3.3.3.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de disfunciones fisiológicas caracterizadas por la hiperglucemia, resultante directamente de la resistencia a la insulina, secreción inadecuada de la insulina o la secreción excesiva de glucagón. Hay dos principales tipos de diabetes, el tipo 1 y 2. La diabetes tipo 1 (T1DM) es un trastorno autoinmune que conduce a la destrucción de las células beta del páncreas. Por otra parte, la diabetes tipo 2 (T2DM), el cual es mucho más común, es principalmente un problema de regulación progresivamente alterada de la glucosa debido a una combinación de células beta pancreáticas disfuncionales y resistencia a la insulina (Blair 2016). La diabetes mellitus afecta a más de 165 millones de personas en el mundo y la T2DM representa el más del 80% de todos los diabéticos, mientras que T1DM representa solamente el 5 – 10% (Yang et al. 2011).

3.3.3.2 α -amilasa y la α -glucosidasa

La hiperglicemia es el incremento anormal de los niveles de glucosa en sangre. Cuando se ingiere un alimento, inicialmente los sustratos poliméricos son digeridos parcialmente por la amilasa salival degradándose en oligómeros cortos. Una vez que el material digerido parcialmente llegue al intestino, es hidrolizado en oligómeros más pequeños por la isoenzima α -amilasa, el cual es sintetizado en el páncreas y excretado al lumen intestinal. Mientras la glucosa va siendo absorbida, los disacáridos y oligosacáridos restantes son degradados a glucosa por la enzima α -glucosidasa presente en el borde de las microvellosidades intestinales.

La α -amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucano de los polisacáridos como el almidón y el glucógeno, liberando oligosacáridos y en menor cantidad, glucosa libre. Por otra parte, la α -glucosidasa es la que cataliza la reacción hidrolítica en los enlaces α -1,4-glucano para liberar glucosa a partir del extremo no-reductor de los sustratos (Figura 5). Algunos ejemplos de este último tipo de enzima es la lactasa, maltasa, sacarasa, entre otros (Tundis, Loizzo, y Menichini 2010).

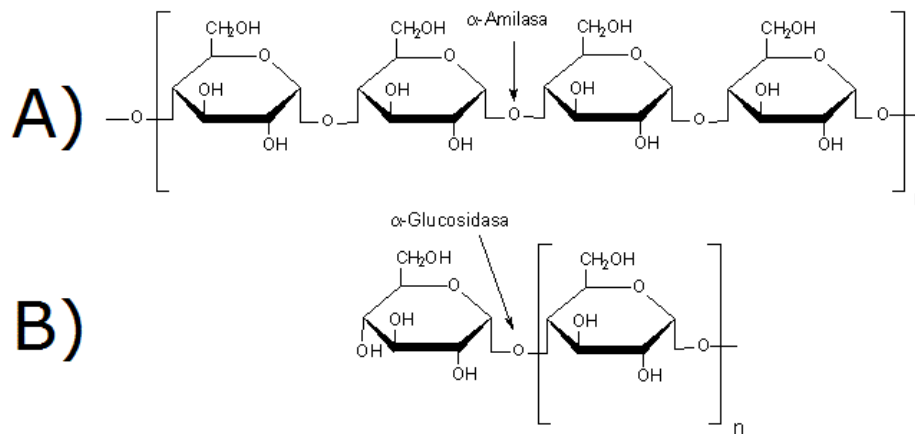


Figura 5. Mecanismo de acción de las enzimas (A) α -amilasa y (B) α -glucosidasa.

Por lo tanto, la inhibición de las enzimas que intervienen en la digestión de los carbohidratos, la α -amilasa y la α -glucosidasa, podría reducir significativamente la glucemia postprandial y de esta manera, mejorar el control del nivel de glucosa en sangre en pacientes con diabetes mellitus (Tundis, Loizzo, y Menichini 2010).

3.3.3.3 Dipeptidil peptidasa-IV

Otra de las estrategias importantes para el control de la glucemia es la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). Usualmente, cuando se consume un alimento, las incretinas GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) y GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) son secretadas por células enteroendócrinas del estómago. Estas hormonas incrementan la secreción de insulina y decrementan la secreción del glucagón, interviniendo así en la homeostasis de la glucosa. En pacientes T2DM, la actividad del GLP-1 con frecuencia se encuentra reducida y se ha observado que la infusión de estas hormonas puede mejorar la función secretora de la insulina. Sin embargo, es difícil utilizar las incretinas como tratamiento terapéutico en DMT2 debido a que tanto el GLP-1 como el GIP tienen una vida media plasmática sumamente corta, además de que son inactivados en pocos minutos, por la enzima DPP-IV. Por ende, al inhibir DPP-IV se impediría que se degraden las incretinas, pudiéndose mejorar el control de la glucosa sanguínea (Figura 6) (Pratley y Salsali 2007; Di Girolamo, Peña, y Pérez 2008).

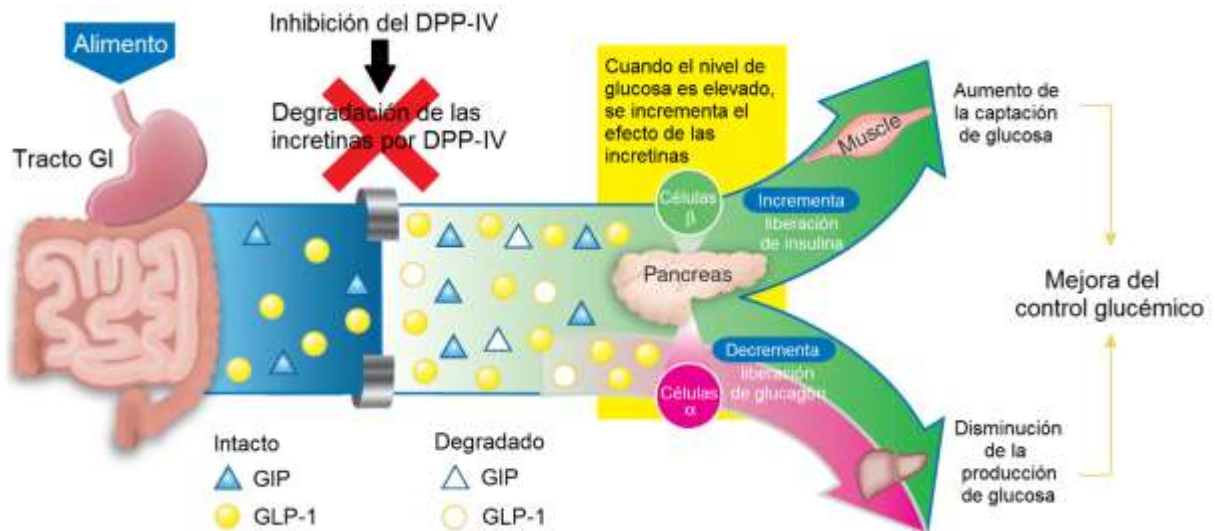


Figura 6. Rol del DPP-IV, GLP-1 y GIP en la homeostasis de la glucosa (May 2009). Al ingerir un alimento, el nivel de glucosa se eleva y las incretinas GLP-1 y GIP son secretados como respuesta. El GIP contribuye a la liberación de la insulina, sin embargo, el GLP-1 tiene un mayor efecto secretagogo de la insulina y estimula de manera notable la biosíntesis de esta. Además, GLP-1 también inhibe la secreción de glucagón, y, por ende, reduce la producción hepática de glucosa, la velocidad de vaciamiento gástrico, el apetito y la ingestión calórica. Al inhibir el DPP-IV, se evitaría la degradación de

las incretinas y se mejoraría el control glucémico (Pratley y Salsali 2007; Di Girolamo, Peña, y Pérez 2008).

3.3.3.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es definido como la formación en exceso y/o remoción insuficiente de moléculas altamente reactivas. En la diabetes mellitus, este mecanismo está activamente provocando daños celulares que pueden preceder a la aparición de muchas complicaciones diabéticas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluye a los radicales libres como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), así como especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los primeros dos son llamados así por tener electrones desapareados (Yang et al. 2011).

Las ROS son producto de una reducción parcial errónea del oxígeno a través de reacciones oxido-reductoras en la cadena de transporte de electrones. Esta reducción es un paso indispensable en la respiración aeróbica y debería de reducir el oxígeno hasta agua con la combinación de dos protones en la reacción (Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG 2013).

Evidentemente el incremento de la actividad metabólica a cualquier escala aumenta la cantidad de ROS generadas de manera secundaria. Cuando la actividad metabólica está por arriba de las condiciones fisiológicas (estrés metabólico), el incremento de ROS se potencia y una cantidad excesiva de protones es acumulado en el espacio intermembranal de la mitocondria. Esto provoca que se incremente la permanencia, tiempo y posibilidad de reducir parcialmente el oxígeno en los diferentes puntos de la cadena respiratoria y, como consecuencia, se genera concentraciones excesivas de $O_2^{\cdot-}$ como subproducto indeseable y estos pueden inducir daño oxidativo (Yang et al. 2011), (Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG 2013).

La acumulación de intermediarios tales como la dihidroxiacetona-P y el gliceraldehído 3-P también provocan daños oxidativos. Sin embargo, no sólo el exceso de glucólisis y la acumulación de intermediarios genera ROS, sino que también el exceso de glucosa puede producir cantidades considerables de ROS al auto-oxidarse,

al reducirse por la vía del poliol o al reaccionar con las proteínas (glicación) formando productos de glicación avanzados (Figura 7) (Yang et al. 2011), (Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG 2013).

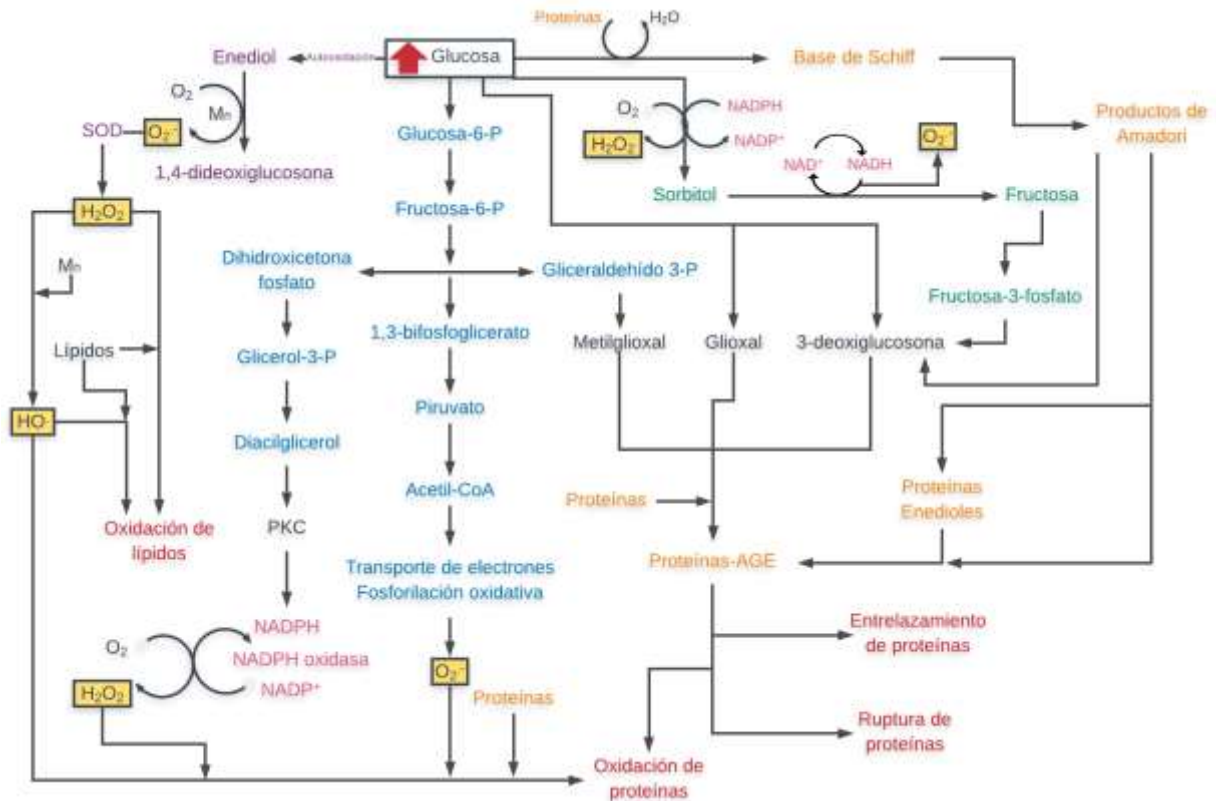


Figura 7. Diferentes rutas metabólicas en donde se muestra cómo la hiperglucemia contribuye al daño oxidativo. En la vía central (color azul) se muestra la respiración aeróbica de la glucosa, el aumento de la glucosa conlleva el aumento de la función mitocondrial, generándose superóxido (O_2^-). En la parte superior izquierda se muestra el camino de la auto-oxidación de glucosa (color morado) por vía del enediol, formando radicales libres O_2^- e hidroxilos (HO^\cdot) y peróxidos de hidrógeno (H_2O_2). En la parte superior derecha, se muestra la glicación de proteínas (color naranja), donde la glucosa se une por enlaces covalentes a grupos amino de proteínas, generando productos de Amadori, los cuales al oxidarse forman productos de glicación avanzados (AGE). Los AGE interactúan con las proteínas provocando su oxidación, entrelazamiento y ruptura. La glucosa también puede formar productos de Amadori como la 3-deoxiglucosona, glicoxal y metilglicoxal (color negro), las cuales pueden interactuar con proteínas para formar AGEs. La glucosa se puede oxidarse a glicoxal y 3-deoxiglucosona, sin embargo, la 3-deoxiglucosona también puede formarse a través de la vía del poliol (color verde), en donde la glucosa es convertida primeramente en sorbitol y posteriormente es transformada en fructosa con la formación de radicales O_2^- y H_2O_2 . El metilglicoxal es formado a partir de la oxidación del gliceraldehído 3-P. En la vía central izquierda se puede observar que el incremento de dihidroxiacetona-

P induce la formación de diacilglicerol, lo que estimula la proteína cinasa C (PKC) y a su vez la NADPH oxidasa generándose H_2O_2 . Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos por diferentes rutas metabólicas inducen la oxidación de proteínas y lípidos, y por consiguiente, un daño oxidativo (Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG 2013).

Finalmente, la sobreproducción de las ROS genera daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y reduce las defensas antioxidantes, la capacidad redox de la célula y la capacidad amortiguadora antioxidante, contribuyendo al desarrollo de las diferentes manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus, como la resistencia a la insulina (Figura 8).



Figura 8. Las ROS producidos por diferentes rutas metabólicas contribuyen al aumento del estrés oxidativo provocando inflamación y resistencia a la insulina (Tangvarasittichai 2015).

Actualmente existen diversos medicamentos que sirven para controlar la diabetes mellitus, sin embargo, son costosos y tienen efectos adversos. La propiedad antioxidante de las antocianinas podría contribuir a la disminución del estrés oxidativo y, por ende, evitar daños celulares y complicaciones diabéticas. Esta propiedad junto con su potencial para inhibir α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa-IV, podría ser una estrategia complementaria para controlar la diabetes mellitus.

3.3.4 Estabilidad

No obstante, las antocianinas son muy inestables y son susceptibles a la degradación. Su estabilidad es afectada por diferentes factores fisicoquímicos, como el pH, su estructura química, concentración, temperatura, luz, oxígeno, y la presencia de enzimas, flavonoides, proteínas e iones metálicos (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017), (Castañeda-Ovando et al. 2009).

3.3.4.1 Influencia del pH

Las antocianinas pueden adaptar diferentes formas químicas dependiendo del pH de la solución donde se encuentra (Castañeda-Ovando et al. 2009; Khoo et al. 2017). La acidez tiene un efecto protector sobre las antocianinas, en soluciones con $\text{pH} < 2$, el ión oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso es la especie predominante y es la forma más estable (Figura 9). Por otra parte, a pH más altos la molécula pierde un protón y se añade agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona, o de cadena abierta (C). Estos compuestos son formas incoloras e inestables. En pH superiores a 7, se presentan las formas quinoidales (A) de color púrpura, sin embargo, se degradan rápidamente por oxidación (Garzón 2008). Cabe mencionar que la solución de antocianina a pH 4 – 5 posee un color morado claro por la presencia del catión flavilio y el anión quinoidal (Khoo et al. 2017).

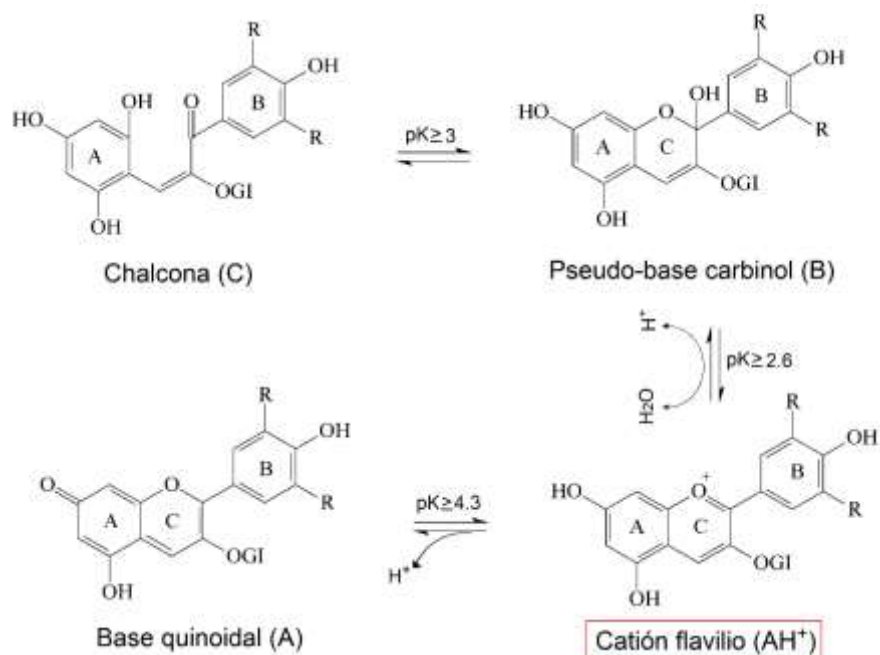


Figura 9. Diferentes formas químicas de la antocianina según el pH. El catión flavilio (AH⁺), encerrado con rojo, es la especie más estable y predomina en pH <2, mientras que a pH entre 2 – 6 predominan las formas pseudo-base carbinol (B) y chalcona (C). A pH mayor de 7, están presentes principalmente bases quinoidales (A).

3.3.4.2 Efecto de la temperatura

Los incrementos de temperatura resultan en la disminución de la coloración de las antocianinas, esto es debido a la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y la apertura del anillo, y, por consiguiente, formándose chalconas incoloras (Garzón 2008).

3.3.4.3 Oxígeno

Ciertos compuestos del medio son oxidados y reacción con las antocianinas para dar compuestos incoloros o cafés. Además, las propias antocianinas son reactivas a radicales de oxígeno ya que se comportan como antioxidantes (Guzmán-Figueroa, Ma del Pilar; Ortega-Regules, Ana; Anaya-Berrios 2010).

3.3.4.4 Enzimas

La enzima polifenol-oxidasa puede provocar la degradación de las antocianinas, no de una manera directa, si no que oxida los otros compuestos fenólicos que acompañan a las antocianinas y obteniéndose como producto quinonas, las cuales son responsables de polimerizar a las antocianinas y formar pigmentos cafés (Guzmán-Figueroa, Ma del Pilar; Ortega-Regules, Ana; Anaya-Berrios 2010; Khoo et al. 2017).

3.3.5 Co-pigmentación

La co-pigmentación es un fenómeno en la cual los pigmentos y los otros compuestos orgánicos o iones metálicos (co-pigmentos), forman una asociación molecular potenciando y estabilizando el color de las antocianinas. Se emplean comúnmente como co-pigmentos compuestos flavonoides, ácidos orgánicos, metales, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos u otras antocianinas (Khoo et al. 2017; Aguilera et al. 2016).

Los co-pigmentos son sistemas ricos en electrones π y son capaces de asociarse con los iones flavilio, los cuales son pobres en electrones. Esta asociación protege a la molécula del ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio y de otras especies como peróxidos o dióxido de azufre en la posición 4. Normalmente los co-pigmentos son incoloros, pero al mezclarse y co-pigmentarse con una solución de antocianina, se produce un efecto hipercrómico y un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción (región UV-Vis) (Castañeda-Ovando et al. 2009).

La co-pigmentación se basa en dos efectos principales (Castañeda-Ovando et al. 2009):

- I. Formación de un complejo $\pi - \pi$ o también conocido como complejo de transferencia de carga, el cual causa cambios en las propiedades espectrales del ion flavilio, incrementando su intensidad de absorción y su longitud de onda (Figura 10).
- II. La estabilización de la forma flavilio por el complejo π desplaza el equilibrio de tal manera que el color rojo incrementa.

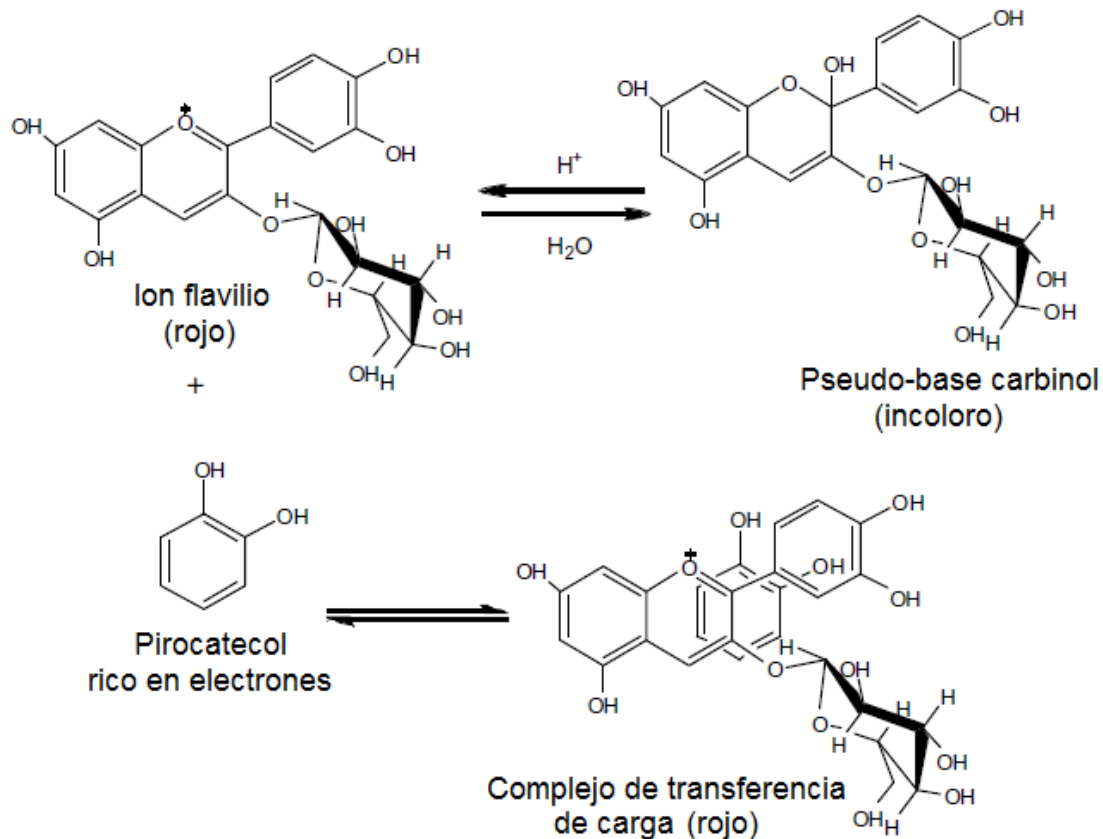


Figura 10. Ejemplo de estabilización de las antocianinas por la formación del complejo de transferencia de carga (interacción de la antocianina con un compuesto fenólico) (Castañeda-Ovando et al. 2009). El ión flavilio puede sufrir un ataque nucleofílico produciéndose pseudo-base carbinol incoloros, sin embargo, al asociarse con el pirocatecol, se forma un complejo de transferencia de carga ofreciéndole protección e intensificación del color.

Se ha observado que entre más grupos hidroxilos tenga el copigmento flavonoide, más fuerte será la co-pigmentación y la formación del complejo. El grupo hidroxilo más importante para la formación del complejo es el que está presente en el carbono 7. Por otra parte, se ha observado que los grupos metoxilos de los co-pigmentos disminuyen el efecto de co-pigmentación (Rein 2005).

Asimismo, cabe mencionar que la interacción antocianina – co-pigmento puede suceder de diferentes maneras dependiendo de la especie que interactúa (Figura 11):

- Si el co-pigmento tiene pares de electrones libres, ocurre una co-pigmentación intermolecular, esta interacción ocurre usualmente cuando el pigmento está en contacto con otros compuestos fenólicos (Figura 11, A).
- Si el co-pigmento es otra antocianina, se forma una auto-asociación o una co-pigmentación intramolecular (Figura 11, B y C).
- Si la interacción es con un metal, se produce una complejación. Es importante destacar que además de los enlaces $\pi - \pi$ presentes por la interacción electrostática de los compuestos aromáticos, el metal (átomo central) se une a las otras moléculas (ligandos) a través de enlaces de coordinación, el cual es un enlace covalente atípico, ya que sólo uno de los átomos proporciona los pares de electrones compartidos (Figura 11, D).

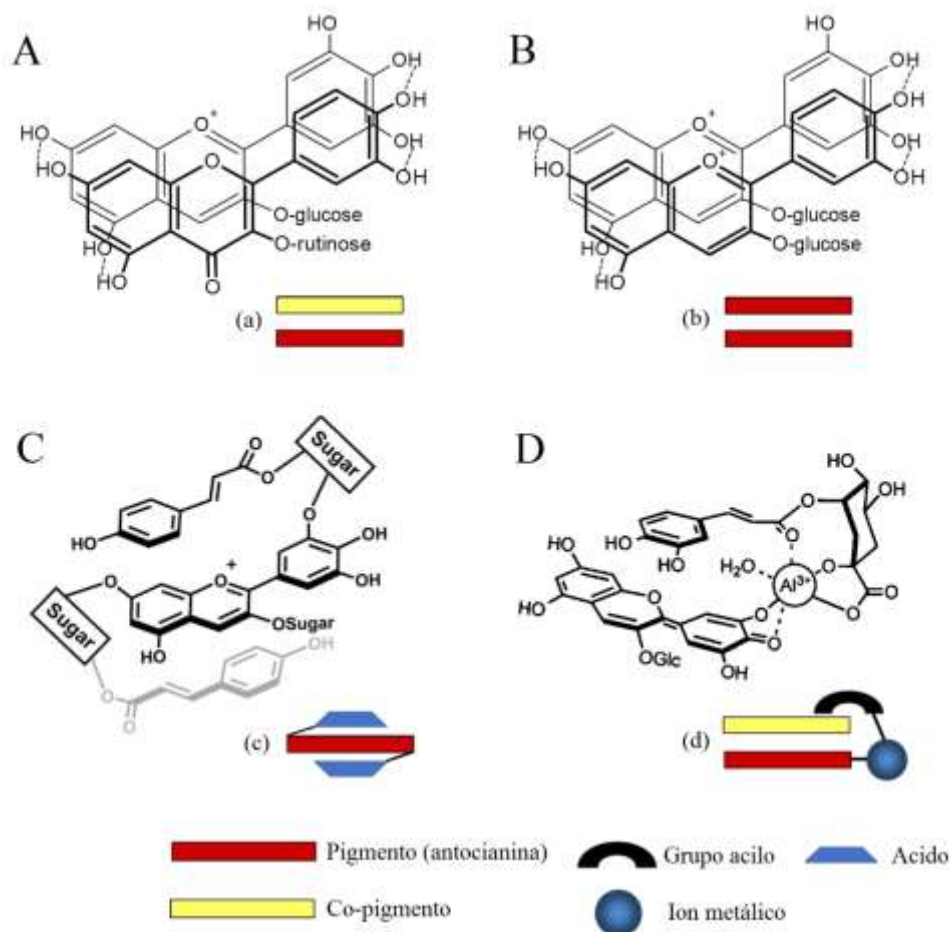


Figura 11. Estabilización de las antocianinas a través de diferentes métodos de co-pigmentación. (A), (a) Co-pigmentación intermolecular, (B), (b) Auto-asociación, (C), (c) Co-pigmentación intramolecular y (D), (d) Complejación de metales. Las letras mayúsculas representan las interacciones con estructuras químicas, mientras que las letras minúsculas muestran una representación gráfica de las interacciones de apilamiento (Rein 2005; Oyama et al. 2015; Trouillas et al. 2016).

3.4 Métodos de extracción

Aunado a lo anterior, el uso de métodos de extracción eficientes podría aumentar significativamente la concentración de antocianinas y otros compuestos fenólicos, mejorando así el efecto de co-pigmentación. Por ende, la estabilidad y el color de las antocianinas podría potenciarse y de esta manera, superar uno de los principales problemas del uso de colorantes naturales.

3.4.1 Lixiviación

La extracción es un proceso donde se separa uno o más componentes a través del contacto con un segundo líquido inmiscible llamado solvente. El sistema de extracción está hecho principalmente por tres componentes: (a) soluto (material a ser extraído), (b) portador o *carrier*, es la parte no soluto de la muestra y (c) solvente, el cual debe de poseer baja solubilidad para el portador. Cuando la materia prima a extraer es un sólido, el proceso es conocido como lixiviación y ambas fases entran en contacto y el soluto puede difundirse desde el sólido a la fase líquida, produciéndose una separación de los componentes originales (Figura 12). La fase rica en solvente se le conoce como el extracto y la fase rica en portador es conocido como refinado (Frank 2010).

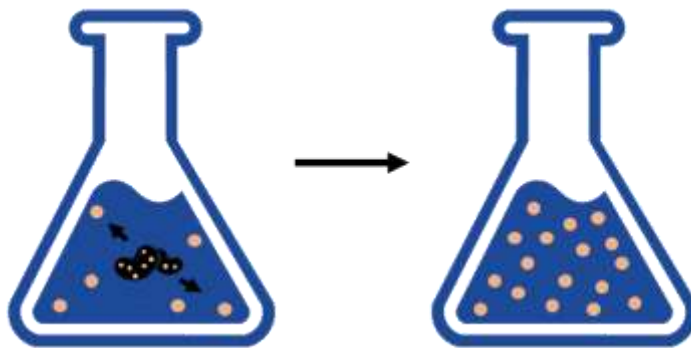


Figura 12. Extracción de compuestos a través de lixiviación. Esta imagen representa la extracción sólido-líquido, en la cual los compuestos de interés (color beige) están contenidos en una muestra sólida (color negro), y al estar en contacto con el solvente, los compuestos de interés son diluidos en el solvente, separándose del portador.

En ocasiones, se emplea la maceración con la lixiviación para disminuir el tamaño de partícula y así, aumentar la superficie de contacto del soluto con el solvente para un mayor rendimiento. La lixiviación tiene la desventaja de ser lento y de requerir más trabajo, sin embargo, no necesita equipos complejos o altas cantidades de energía para la separación.

Algunos de los métodos alternativos para el método de lixiviación, es el uso de solventes a altas presiones y fluidos supercríticos. Estos métodos permiten controlar temperaturas y presiones de la extracción, de tal manera que el solvente pueda tener

una mayor interacción con el soluto, pudiéndose extraer los compuestos de interés con una mayor eficiencia con respecto a la lixiviación. Además, los compuestos fenólicos pueden estar tanto en formas solubles como insolubles. La mayoría de los compuestos fenólicos solubles están localizados en las vacuolas de las células vegetales, donde se encuentran atrapados, mientras que, los compuestos fenólicos insolubles están presentes en la pared celular. Estos últimos están unidos a macromoléculas como proteínas estructurales, celulosa y pectina a través de enlaces covalentes tipo éter, éster y carbono-carbono en la pared celular, formándose compuestos fenólicos ligados-insolubles (Shahidi y Yeo 2016). Por lo tanto, utilizar métodos como solventes a altas presiones y fluidos supercríticos podrían extraer esos compuestos fenólicos ligados-insolubles que normalmente no se logran con la lixiviación, obteniéndose así un extracto rico en compuestos fenólicos que podrían co-pigmentarse con las antocianinas mejorando su estabilidad y rendimiento.

3.4.2 Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La técnica de líquidos presurizados consiste en realizar una extracción sólido-líquido con modificaciones en la temperatura y presión. El aumento de la temperatura en una extracción tiende a mejorar la eficiencia de esta debido a la reducción de la tensión superficial, permitividad relativa, viscosidad o el incremento de la difusibilidad del solvente (Benito-Román et al. 2015). Al combinar presión y temperatura también ayuda a debilitar puentes de hidrógeno formado entre las diferentes moléculas, liberando con mayor facilidad los compuestos de interés. El diagrama general del sistema está representado en la Figura 13.

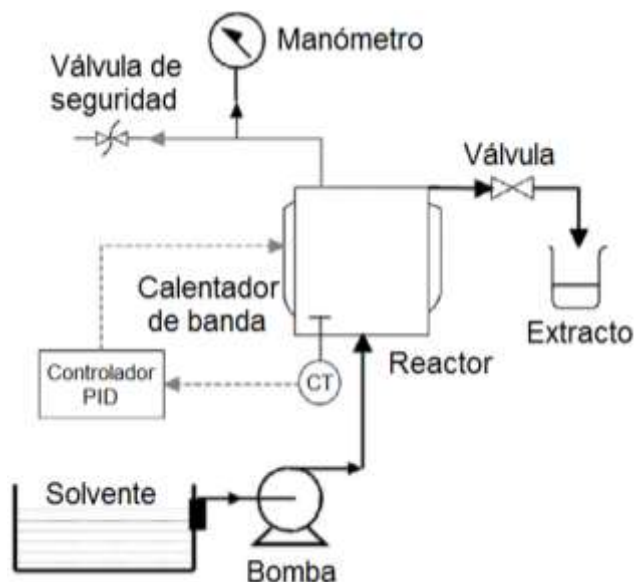


Figura 13. Diagrama general del sistema de extracción con solventes altamente presurizados (Benito-Román et al. 2015). En este tipo de sistemas, el solvente es bombeado hasta el reactor, donde se encuentra la muestra. La presión y la temperatura del reactor se puede monitorear y ajustar a través del controlador PID. Al final de la extracción, se obtiene el extracto a través de una válvula de salida.
*controlador PID: controlador proporcional-integral-derivativo.

3.4.3 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Por otra parte, la extracción con fluidos supercríticos es similar a líquidos presurizados. Sin embargo, la diferencia es que el primero utiliza solventes que se encuentren en su fase supercrítico, es decir, que está en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. El fluido supercrítico presenta propiedades intermedias entre gas y líquido (Sahena et al. 2009).

El fluido supercrítico que más se utiliza es el dióxido de carbono, ya que es económico, no es tóxico, ni inflamable y se puede recuperar con facilidad. Además, el punto crítico del CO₂ es alcanzado fácilmente con respecto a otras sustancias, teniendo una presión crítica de 73 atm y una temperatura crítica de 31.1°C (Figura 14) (Casas et al. 2007).

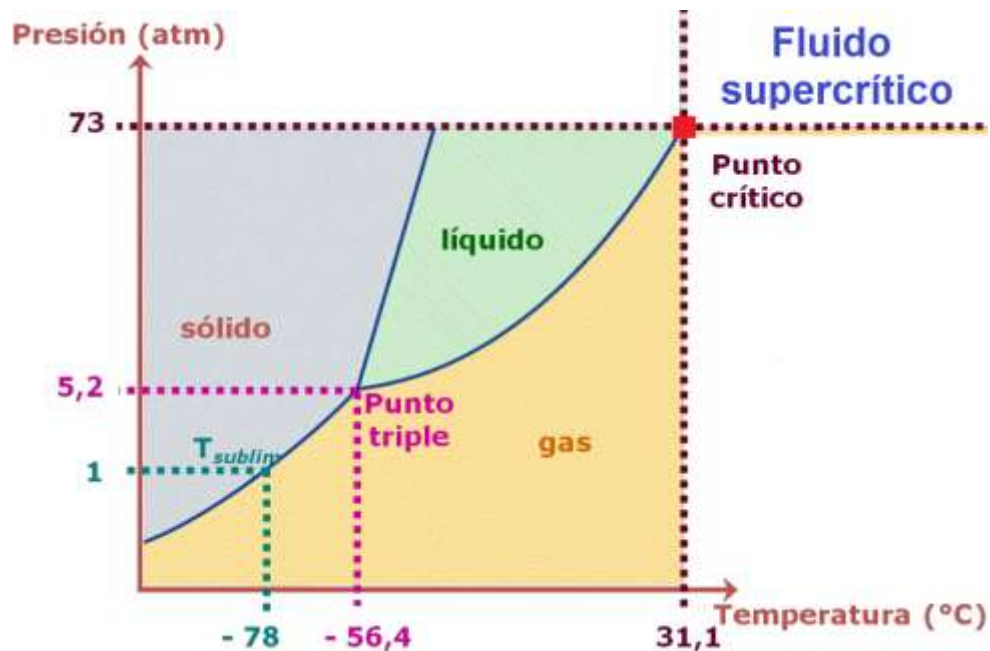


Figura 14. Diagrama de fases del dióxido de carbono. Superando el punto crítico (31.1°C y 73 atm), la sustancia pasa a ser un fluido crítico, teniendo propiedades intermedias entre gas y líquido.

El CO₂ como fluido supercrítico presenta una densidad líquida y una alta difusividad gaseosa, por lo que puede disolver solutos y, además, penetrar en los poros de los sólidos. La densidad de un fluido supercrítico incrementa al aumentar la presión y, al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en el fluido supercrítico aumenta de manera considerable. Otra ventaja del fluido supercrítico es que, una vez extraído el compuesto de interés, se puede aislar y concentrar fácilmente a través de la evaporación del CO₂. Finalmente, el CO₂ puede reciclarse invirtiendo el cambio en las condiciones de temperatura y presión (Sahena et al. 2009).

Debido a que el CO₂ no es polar, la extracción de compuestos fenólicos se ve favorecida con el uso de co-solventes, como el etanol (Casas et al. 2007). Esto puede atribuirse a que la adición de un co-solvente generalmente aumenta la densidad de la mezcla, por lo que aumenta la magnitud de las interacciones físicas como dipolo-dipolo, dipolo dipolo-inducido y dipolo inducido-dipolo inducido entre las moléculas del soluto y solvente, por lo que mejora la solubilidad general. Además, la adición de co-solventes polares puede ayudar a formar interacciones específicas como puentes de hidrógeno entre el soluto y el co-solvente, dando una solubilidad mayor que la obtenida

con interacciones no específicas (Kopcak y Mohamed 2005). El diagrama general del sistema de extracción con fluidos supercríticos se puede observar en la Figura 15.

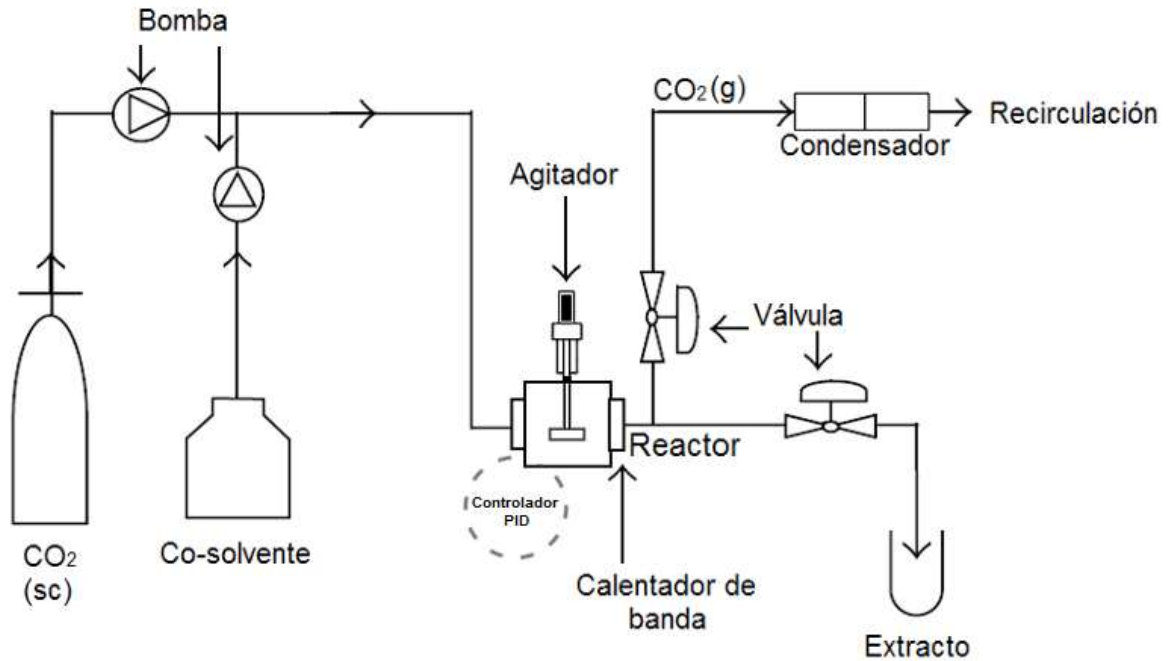


Figura 15. Diagrama general del sistema de extracción con fluidos supercríticos (Juliasih et al. 2016). El CO_2 supercrítico es bombeado junto con el co-solvente para poder extraer compuestos polares. Ambos compuestos llegan al reactor, donde se pone en contacto con la muestra, disolviéndolo y difundiendo en los poros. El agitador del reactor permite una mayor superficie de contacto del fluido con la muestra. Finalmente, se puede obtener el extracto a través de una válvula y el CO_2 en forma gaseosa puede ser recuperado a través de una trampa y volver a ser presurizado y pasarse a la fase supercrítica. *sc: supercrítico, g: gas, controlador PID: controlador proporcional-integral-derivativo.

Por consiguiente, el frijol negro es una fuente económica de antocianinas y otros compuestos fenólicos, los cuales tienen el potencial de ser utilizados como colorantes naturales y, además, aportar efectos benéficos a la salud por sus propiedades antioxidantes y antidiabéticas. Al emplearse métodos de extracción eficientes como el SFE y PLE, se podría extraer una mayor cantidad de antocianinas y otros compuestos fenólicos que la lixiviación convencional, y de esta manera, mejorar la estabilidad y el potencial biológico del extracto rico en antocianinas por el efecto de co-pigmentación.

En base a lo anterior, el presente estudio evaluó el rendimiento, estabilidad y potencial biológico del extracto rico en antocianinas del frijol negro variedad San Luis a través de lixiviación, líquidos presurizados y fluidos supercríticos.

4. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, el frijol negro puede ser una fuente económica de antocianinas y otros compuestos fenólicos, los cuales se han reconocido como una alternativa prometedora para sustituir los colorantes sintéticos, lo anterior debido a su capacidad de conferir colores desde rojo hasta violeta y a los efectos benéficos que puede aportar a la salud por sus propiedades antioxidantes y antidiabéticas. Sin embargo, uno de las principales limitantes para favorecer el uso de estos compuestos es su bajo rendimiento y su estabilidad, lo cual podría mejorarse significativamente utilizando un método de extracción apropiado. En este sentido, el uso de solventes a altas presiones o fluidos supercríticos resulta en una estrategia con gran potencial. Estos métodos de extracción favorecen el rompimiento celular y el contacto del solvente con el soluto, pudiendo extraer compuestos fenólicos ligados-insolubles que normalmente no se sustraen con los métodos convencionales, de manera que se podría potenciar el efecto de la co-pigmentación y, por ende, aumentar la estabilidad e incluso el efecto antioxidante y antidiabetes. Por consiguiente, en este trabajo se evaluó el rendimiento, estabilidad y potencial biológico del extracto rico en antocianinas recuperado del frijol negro variedad San Luis a través de lixiviación, líquidos presurizados y fluidos supercríticos.

5. HIPÓTESIS

La extracción con líquidos presurizados y fluidos supercríticos aumenta la recuperación de antocianinas y otros compuestos fenólicos del frijol negro en comparación con la lixiviación convencional, dando lugar a una mayor estabilidad y potencial biológico.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Evaluar el rendimiento, estabilidad y potencial biológico del extracto rico en antocianinas del frijol negro variedad San Luis recuperado a través de lixiviación, líquidos presurizados y fluidos supercríticos.

6.2 Objetivos específicos:

- I. Comparar diferentes métodos de descascarillado a través de lixiviación.
- II. Optimizar la extracción de antocianinas utilizando líquidos presurizados y fluidos supercríticos y compararlo contra la lixiviación convencional.
- III. Caracterizar los compuestos fenólicos de los extractos ricos en antocianinas a través de UHPLC y UPLC-QToF-MS/MS.
- IV. Evaluar la estabilidad a la luz y al almacenamiento del extracto rico en antocianinas con mayor rendimiento.
- V. Determinar el potencial biológico de los extractos ricos en antocianinas por medio de pruebas bioquímicas.

7. METODOLOGÍA

7.1 Materiales

El frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad "San Luis" se adquirió de vendedores locales en la ciudad de Sombrerete, Zacatecas, México en 2017. Etanol (95%), (+)-hidrato de catequina (98%), ácido clorogénico (95%), miricetina (99%), ácido ferúlico (98%), kaempferol (90%), quercetina (95%), ácido siríngico (95%), epicatequina (90%), ácido p-cumarico (98%) , hidrato de rutina (94%), acetonitrilo (99%), ácido fórmico (99%), metanol (99%), ácido clorhídrico (95%), monohidrato de ácido cítrico (>98%), cloruro de potasio (95%), ácido etilendiaminotetraacético (99%), acetato de sodio (95%), carbonato de sodio (>98%), ácido gálico (97.5%), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (>98%), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (98%), ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox®) (97%), α -amilasa del páncreas porcino (EC3.2.1.1), α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC3.2.1.20), acarbosa ($\geq 95\%$), enzima humana dipeptidil peptidasa-IV, ácido 3,5-dinitrosalicílico ($\geq 98\%$) , p-4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido ($\geq 99\%$), almidón soluble, buffer de fosfato, reactivo de folin-ciocalteu, fosfato de sitagliptina, ácido acético (99%), delphinidina 3-O-glucósido ($\geq 98\%$), malvidina 3-O-glucósido ($\geq 98\%$) y cianidina 3-O-glucósido ($\geq 98\%$) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EUA). El kit de ensayo DPP-IV Glo® se adquirió de Promega (Madison, WI, EUA).

7.2 Método de descascarillado del frijol

Se evaluaron los siguientes métodos de descascarillado:

- A. Descascarillado manual (M).
- B. Remojar el frijol en agua (relación 1:0.75) por 16 horas a 4°C, posteriormente moler ligeramente y separar la cascarilla. En caso de no remover la cascarilla completamente, refrigerar nuevamente por 16 horas a 4°C y separar la cascarilla por completo (M1).
- C. Escaldar el frijol por 2 minutos y posteriormente hidratar el frijol con agua en una relación 1:1.05 por 4 horas a 40°C. Después, refrigerar por 16 horas a 4°C y secarlo por 5 horas a 50°C (M2).

Una vez descarrillado, se molió y se tamizó con una malla 40 para obtener un tamaño de partículas uniforme.

7.3 Extracción por lixiviación (LEA)

La extracción se realizó según lo reportado por (Mojica et al. 2015). Se tomaron 100 mg de cascarilla de frijol o 1.18 g de frijol completo triturado (equivalente a 100 mg de cascarilla de frijol) y se mezclaron con 10 mL de etanol acidificado (etanol en HCl 1N, 85:15, v/v). La solución se mantuvo en agitación continua por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó por 10,000 RPM durante 15 minutos y el volumen final se ajustó a 10 mL con etanol acidificado. Los extractos se almacenaron a -20°C hasta análisis.

7.4 Extracción por líquidos presurizados (PLE)

La extracción PLE se realizó utilizando un extractor Thar® SFE500 modificado (Thar Process, Pittsburgh, PA, EUA) equipado con una celda de extracción de acero inoxidable (volumen de 500 mL). Se pesaron 75.8 ± 1.0 g de frijol negro entero y se colocaron en la celda de extracción. Antes de cada extracción, la celda de extracción se calentó hasta alcanzar la temperatura deseada. Según el diseño experimental, la celda de extracción se llenó con el solvente de extracción apropiado, se presurizó y se calentó bajo condiciones controladas de PLE. Se empleó un período de 15 minutos para llevar a cabo todas las extracciones del diseño experimental.

Se evaluaron temperaturas de 40, 50 y 60°C y presiones de 100, 200 y 250 bares. Además, se utilizó agua acidificada, etanol-agua al 50% (v/v) y etanol-agua al 70% (v/v) como solventes de extracción, y se usó ácido cítrico monohidratado para ajustar el pH a 2.0 ± 0.1 . Los extractos obtenidos se transfirieron a un recipiente ámbar y se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

7.5 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

La extracción SFE se realizó utilizando un extractor Thar® SFE500 (Thar Process, Pittsburgh, PA, EUA) equipado con una celda de extracción de acero inoxidable (volumen de 500 mL). Para el experimento, se pesaron 50 ± 1.0 g de frijol negro entero

y se colocaron en la celda de extracción mezclados con 20 ± 1.0 g de perlas de vidrio. Luego, el dióxido de carbono gaseoso se presurizó y se introdujo a un flujo de 10 g/min con 10% del co-solvente apropiado. Se presurizó a la presión deseada y se calentó a la temperatura especificada para alcanzar el estado supercrítico, todas las extracciones del diseño experimental se llevaron a cabo durante 60 minutos.

Para SFE, se evaluaron temperaturas de 40, 50 y 60°C y presiones de 160, 200 y 300 bares. Además, se utilizó agua acidificada, etanol-agua al 10% (v/v) y etanol-agua al 50% (v/v) como co-solventes de extracción. Se usó ácido cítrico monohidratado para ajustar el pH a 2.0 ± 0.1 . Los extractos obtenidos se transfirieron a un recipiente ámbar y se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

7.6 Identificación de antocianinas por UHPLC

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) utilizando un sistema Waters Acquity UPLC H-Class (Milford, MA, EUA), Equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un calentador de columna. La separación cromatográfica se realizó a 45°C en una columna Waters Cortecs UPLC C18 (4,6 x 50 mm, 2,7 μm). Se utilizaron dos fases móviles: (A) acetonitrilo y (B) metanol al 5% y ácido fórmico al 0.1% en agua. La elución del gradiente fue la siguiente: 0 – 2% A en 0 – 2 min, 2 – 7% A en 2 – 5 min, 7 – 13% A en 5 – 7 min, 13 – 20% A en 7 – 9 min, 20 – 55% A en 9 – 11.5 min, 55 – 90% A en 11.5 – 13.5 min, 90% A en 13.5 – 14.5 min, 90 – 3% A en 14.5 – 14.95 min, 3% A en 14.95 – 18 min, 3 – 0% A en 18 – 20 min. El flujo se mantuvo a 0.25 mL/min, y el volumen de inyección fue de 10 μL .

7.7 Identificación de compuestos fenólicos no coloreados por UPLC-QToF-MS/MS

El análisis cromatográfico se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC H-Class (Milford, MA, EUA) equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un calentador de columna. La separación cromatográfica se llevó a cabo a 40°C con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min en una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μm). Se utilizaron dos fases móviles: (A) 0.3% de ácido

fórmico en acetonitrilo y (B) 0.3% de ácido fórmico en agua. La elución en gradiente fue la siguiente: 90% A en 0 – 1 min, 90 – 30% A en 1 – 11 min, 30 – 90% A en 11 – 12 min, 90% en 12 – 15 min. El volumen de inyección se ajustó a 8 μ L.

El análisis de espectrometría de masas (MS) se realizó en una espectrometría de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo Water Xevo G2-XS QToF equipada con una interfaz de ionización por electrospray (ESI) (Milford, MA, EUA). La adquisición de MS se realizó en modo de ion negativo, y el rango de masa se estableció a m/z 50 a 800. Los parámetros se establecieron de la siguiente manera: voltaje capilar: 2.5 kV, voltaje de cono: 40 kV, temperatura de la fuente: 100°C, temperatura de desolvatación: 250°C, energía de colisión: 6.0 eV. Se utilizó el software MassLynx 4.1 MS (Milford, MA, EUA) para controlar los instrumentos y procesar los datos.

7.8 Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC) y antocianinas totales

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron utilizando el método Folin-Ciocalteu descrito por (Mojica et al. 2015). Se colocaron 50 μ L de extracto, blanco (agua destilada) o estándar de ácido gálico (curva de calibración, 40 – 200 μ g/mL) en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 50 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 1N, se mezclaron y se dejaron reposar durante 5 minutos antes de la adición de 100 μ L de Na₂CO₃ al 20%. Finalmente, se dejó reposar durante 10 minutos antes de leer a una absorbancia de 690 nm con un espectrofotómetro UV-visible. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de cascarilla de frijol (mg GAE/g cascarilla).

Las antocianinas totales se determinaron por el método de pH diferencial (Método oficial AOAC 2005.02). Los extractos se diluyeron a un factor de 1:10 v/v con cloruro de potasio (pH 1.0, 0.025 M) y acetato de sodio (pH 4.5, 0.4 M). Las muestras diluidas con cada pH se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 520 y 700 nm usando un espectrofotómetro UV-visible. Las antocianinas totales se expresaron en mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de cascarilla de frijol (mg C3GE/g cascarilla), utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

Donde A= (A_{520nm} - A_{700nm}) pH1.0 - (A_{520nm} - A_{700nm}) pH 4.5, MW= Peso molecular para cianidina-3-glucósido 449.2 g/mol, DF= Factor de dilución (1:5), ε= Coeficiente de extinción molar 26 900 L·mol⁻¹·cm⁻¹ para cyd-3-glu, l= longitud de paso de la cubeta en centímetros.

7.9 Evaluación de la estabilidad de antocianinas y su color

La concentración de antocianinas y la estabilidad del color, se analizaron en agua saborizada (Bonafont® Levité Fresa-Lychee) a través de dos experimentos diferentes en los que se evaluaron el efecto de la luz y el del almacenamiento. En el experimento del efecto de la exposición a la luz, las muestras en se expusieron a luz fluorescente blanca durante 10 días a 32°C, tomando muestra cada dos días. Los controles fueron las mismas muestras almacenados en oscuridad a 32°C. El experimento del efecto de almacenamiento se realizó a 4, 25, y 32°C durante 6 semanas en oscuridad, tomando muestra cada semana. El pH se controló a lo largo de ambos experimentos. Las soluciones iniciales se ajustaron a una concentración de 3.5±0.1 mg C3GE/L y sus pH a 1.86.

7.10 Medición del color

El color se midió usando un espectrofotómetro CM-5 (Konika Minolta Sensing Americas, Inc. Ramsey, NJ, EUA). El equipo se calibró con agua destilada y se usaron los siguientes parámetros: L*, a* y b*; observador/iluminante: 10° y D65 y longitud del recorrido óptico: 1 cm. Se colocó 10±1.0 mL de muestra en una celda de plástico de 10 mm para posteriormente medir y registrar los parámetros de color (L*, a* y b*). El cambio de color (ΔE*) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

7.11 Cinética de reacción de antocianinas

La degradación de antocianinas en soluciones acuosas sigue una cinética de primer orden (Aguilera et al. 2016; Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017). Las constantes de velocidad de reacción de primer orden (k), tiempo de vida media (t_{1/2}),

energía de activación (E_a) y el cambio en la constante de velocidad de reacción para 10°C (Q_{10}) se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$\ln A_t = A_0 - kt; \quad t_{1/2} = -\ln 0.5 \cdot k^{-1}$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right); \quad Q_{10} = e^{\left(\frac{E_a}{R} \right) \left(\frac{10}{T_2 T_1} \right)}$$

Donde A_t es la antocianina monomérica total en el tiempo t , A_0 es la antocianina monomérica total en el tiempo cero; k es la reacción constante en los días⁻¹; t es el tiempo en días; A es el factor pre-exponencial de Arrhenius; E_a es la energía de activación (kJ/mol); R es la constante de gas (8.314 J/mol-K), y T es la temperatura en Kelvin.

7.12 Inhibición de α -amilasa y la α -glucosidasa

La inhibición de las enzimas se midió utilizando el método descrito por (Mojica et al. 2015). Para la α -amilasa, se colocó 50 μL de extracto, control negativo (agua destilada) o control positivo (acarbosea 1 mM) en tubos Eppendorf® de 2 mL. Para el blanco, se agregó 50 μL de buffer de fosfato de sodio 0.02 M (PBS) pH 6.9 y para las muestras, 50 μL de solución de α -amilasa 13U/mL (tipo VI-B del páncreas porcino en PBS 0.02 M pH 6.9). Después de eso, los tubos se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a 37°C antes de agregar 50 μL de almidón soluble al 1% (previamente disuelto en PBS y hervido durante 10 minutos) a cada tubo e incubar durante otros 10 minutos. Finalmente, se añadieron 100 μL de reactivo de ácido dinitro salicílico y los tubos se hirvieron durante 5 min. La mezcla se diluyó con 1 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm. Los resultados se reportaron como valores de IC_{50} (mg C3GE/g de cascarilla).

Para la α -glucosidasa, se colocaron 50 μL de extracto, control negativo (agua destilada) o control positivo (acarbosea 1 mM) en una placa de 96 pocillos. Para el blanco, se agregó 50 μL de PBS 0.1 M pH 6.9 y para las muestras, 50 μL de solución de α -glucosidasa 1U/mL (en PBS 0.1 M pH 6.9). Después de eso, la microplaca se incubó durante 10 minutos a 37°C antes de agregar 50 μL de solución de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido 5 mM (en PBS 0.1 M pH 6.9) a cada pocillo y se incubó durante

otros 5 minutos. Finalmente, la absorbancia se leyó a 405 nm. Los resultados se reportaron como IC₅₀ (mg C3GE/g de cascarilla).

7.13 Inhibición de DPP-IV

La inhibición de DPP-IV se midió mediante el ensayo de proteasa DPP-IV Glo®. 40 µL de control negativo (agua destilada), 40 µL de control positivo (sitagliptina 5 µM) o 40 µL de extracto, se mezcló con 50 µL de reactivo DPP-IV y se colocó en una placa de 96 pocillos de fondo blancas. La enzima humana DPP-IV se preparó en buffer (Tris 100 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) a una concentración de 10 ng/mL. El blanco contenía solo buffer y reactivo DPP-IV, mientras que el control y las muestras contenían reactivo DPP-IV y 10 µL de enzima humana DPP-IV purificada. La luminiscencia se midió después de mezclar e incubar durante 30 minutos a 27°C utilizando un SpectraMax® i3 Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). El porcentaje de inhibición se calculó a partir del blanco y el control enzimático para cada muestra. Los resultados se presentaron como IC₅₀ (mg C3GE/g de cascarilla).

7.14 Capacidad antioxidante

Se determinará a través de dos métodos comparativos, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]).

Para DPPH, se colocaron 20 µL de extracto, blanco (agua destilada) o estándar Trolox® (curva de calibración, 0.01 – 0.25 mM) en una microplaca de 96 pocillos. Luego, se agregó 180 µL de DPPH (2.36 mg DPPH/100 mL de etanol–agua 80:20, v/v), se mezcló y se dejó reposar durante 30 minutos antes de leer a una absorbancia de 517 nm con un espectrofotómetro UV-visible. Los resultados se expresaron como valores de IC₅₀ (mg C3GE/g de cascarilla).

Para ABTS, el radical libre se generó mezclando 100 mL de H₂O con ABTS 3.5 mM y Na₂S₂O₈ 1.225 mM y dejando reposar durante 12 – 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Antes del análisis, la solución se ajustó con agua destilada a una absorbancia de 0.7±0.02 a 734 nm. Se colocó 20 µL de extracto, blanco (agua

destilada) o estándar Trolox® (curva de calibración, 0.01 – 0.25 mM) en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se agregó 180 µL de ABTS, se mezcló y se leyó a una absorbancia de 734 nm con un espectrofotómetro UV-visible. Los resultados se expresaron como valores de IC₅₀ (mg C3GE/g de cascarilla).

7.15 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar la extracción de antocianinas y TPC. Los experimentos se establecieron en base a un experimento de diseño D-optimal con un modelo cuadrático y un total de 22 corridas. Los datos experimentales de optimización se analizaron con Stat Easy Design Expert 10.0.1.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA). Se utilizó ANOVA de una vía para evaluar los datos observados y los coeficientes de regresión de términos lineales, cuadráticos y de interacción y sus efectos fueron analizados. Todos los términos en el modelo se probaron estadísticamente usando la prueba F ($p < 0.05$).

Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizaron con réplicas independientes. Los datos obtenidos se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software estadístico StatPoint STATGRAPHICS Centurion XVI 16.1.03 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EUA). Las diferencias estadísticas entre las variables independientes se determinaron mediante la prueba Tukey Posthoc ($p < 0.05$). Las diferencias entre la media de dos muestras se determinaron usando una prueba t de dos muestras ($p < 0.05$). Los gráficos de correlación se crearon con el software GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Comparación de los métodos de descascarillado a través de la lixiviación

En la Figura 16 se puede observar la concentración de compuestos fenólicos totales (TPC) y antocianinas en los extractos recuperados a través de diferentes métodos de descascarillado.

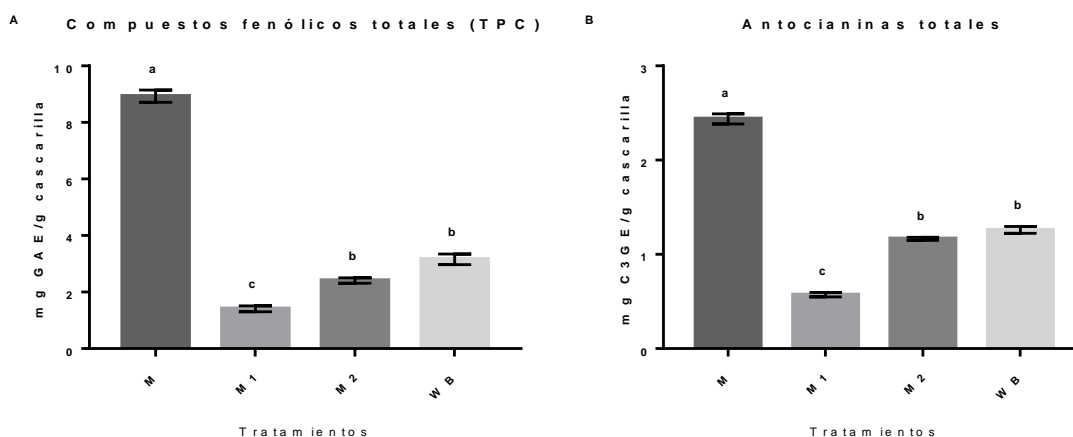


Figura 16. Concentración de compuestos fenólicos totales (A) y antocianinas totales (B) en muestras sometidas a diferentes métodos de descascarillado. M: Descascarillado manual, M1: Descascarillado por el método uno, M2: Descascarillado por el método dos, WB: Frijol completo triturado, GAE: Equivalentes de ácido gálico, C3GE: Equivalentes de cianidina-3-glucosa. Letras distintas indican una diferencia significativa Tukey $p < 0.05$ entre los grupos de cada columna.

En la cascarilla del frijol descascarillado a mano (M) se logró recuperar la mayor cantidad de compuestos fenólicos, obteniéndose concentraciones de TPC de 8.92 ± 0.21 mg GAE/g cascarilla y antocianinas de 2.43 ± 0.05 mg C3GE/g cascarilla. Para M1, se registró una concentración de TPC de 1.40 ± 0.10 mg GAE/g cascarilla y antocianinas de 0.57 ± 0.024 mg C3GE/g cascarilla, mientras que para M2 fue de 2.40 ± 0.09 mg GAE/g cascarilla y 1.16 ± 0.01 mg C3GE/g cascarilla, respectivamente. Las concentraciones obtenidas para M1 y M2 fueron estadísticamente inferiores ($p < 0.05$) a las de la muestra M. Esto podría deberse a que la muestra M no fue remojado en agua, por lo que se evita la pérdida de los compuestos a través del mismo fenómeno de la lixiviación. Asimismo, es importante tomar en cuenta el tiempo que la muestra fue remojada en agua. En el caso de M1, el frijol fue remojado durante 16

horas mientras que M2 fue de 4 horas, razón por la cual se pudo haber recuperado una mayor cantidad de compuestos fenólicos en la muestra obtenida por el segundo método.

Respecto al frijol triturado (WB), la cantidad extraída de TPC y antocianinas fueron estadísticamente iguales a la obtenida con el M2, registrando concentraciones de 3.15 ± 0.18 mg GAE/g cascarilla y 1.25 ± 0.03 C3GE/g cascarilla, respectivamente. La disminución de la cantidad de compuestos fenólicos en el WB a comparación con M puede ser debido a la degradación por las enzimas o por la interacción con otros compuestos provenientes del cotiledón (Yeo y Shahidi, 2019). Como se observa en la Figura 16, la pérdida de TPC es de aproximadamente 66% y las antocianinas de 50%, en comparación con M.

Es importante mencionar de acuerdo a los resultados, que el método de descascarillado a mano requiere de un tiempo considerable y no es escalable. En este sentido, sería preferible obtener grandes cantidades de muestra ya sea como frijol completo o utilizar el método de descascarillado M2, aunque las concentraciones sean menores.

8.2 Extracción de antocianinas con líquidos presurizados y fluidos supercríticos

El diseño experimental utilizado para optimizar la extracción de antocianinas con líquidos presurizados (PLE) se puede ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz de diseño experimental D-optimal para la extracción con líquidos presurizados

Corrida	Presión	Temperatura	Co-solvente	Antocianinas (mg C3GE/g cascarilla)	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g cascarilla)
1	250	40	EtOH-H ₂ O 70%	1.14±0.01 ⁱ	3.86±0.35 ^k
2	250	40	EtOH-H ₂ O 70%	0.53±0.006 ^l	1.79±0.05 ^l
3	100	40	EtOH-H ₂ O 70%	0.65±0.005 ^k	1.89±0.008 ^l
4	250	60	EtOH-H ₂ O 70%	2.61±0.06 ^a	11.89±0.14 ^a
5	100	40	EtOH-H ₂ O 70%	0.73±0.008 ^k	2.13±0.04 ^l
6	100	60	EtOH-H ₂ O 70%	2.13±0.03 ^{ef}	7.45±0.14 ^f
7	100	60	EtOH-H ₂ O 70%	2.19±0.02 ^{de}	7.39±0.07 ^{fg}
8	200	60	EtOH-H ₂ O 50%	2.23±0.04 ^d	8.77±0.15 ^d
9	100	40	EtOH-H ₂ O 50%	1.28±0.02 ⁱ	4.02±0.05 ^k
10	200	40	EtOH-H ₂ O 50%	1.90±0.008 ^g	6.29±0.05 ^{hi}
11	100	60	H ₂ O acidificada	1.86±0.05 ^g	8.85±0.14 ^d
12	100	50	H ₂ O acidificada	1.32±0.03 ⁱ	5.84±0.11 ^{ij}
13	250	60	H ₂ O acidificada	1.85±0.04 ^g	8.38±0.14 ^{de}
14	100	40	H ₂ O acidificada	0.67±0.005 ^k	3.59±0.08 ^k
15	200	40	H ₂ O acidificada	1.08±0.01 ^j	5.63±0.18 ^j
16	200	50	H ₂ O acidificada	1.61±0.02 ^h	6.82±0.09 ^{gh}
17	100	50	EtOH-H ₂ O 50%	2.14±0.06 ^{def}	7.91±0.59 ^{ef}
18	250	40	H ₂ O acidificada	0.75±0.01 ^k	4.05±0.09 ^k
19	250	50	EtOH-H ₂ O 50%	2.08±0.02 ^f	7.44±0.21 ^f
20	200	60	EtOH-H ₂ O 50%	2.33±0.03 ^c	9.72±0.11 ^c
21	250	50	H ₂ O acidificada	1.30±0.007 ⁱ	5.59±0.22 ^j
22	250	60	EtOH-H ₂ O 70%	2.48±0.001 ^b	10.43±0.2 ^b

EtOH: etanol, H₂O: agua, C3GE: equivalentes de cianidina 3-glucósido, GAE: equivalentes de ácido gálico. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una columna ($p < 0.05$, análisis post hoc de Tukey HSD).

El análisis del modelo de superficie de respuesta mostró que la recuperación de antocianinas y TPC se vio afectada principalmente por la temperatura y el co-solvente utilizado (Figura 17, A y B). La concentración más alta de antocianinas y TPC con PLE fue de 2.25 mg de C3GE/g cascarilla y 7.05 mg de GAE/g cascarilla, respectivamente, usando 250 bar, 60°C y como co-solvente etanol-agua al 50%.

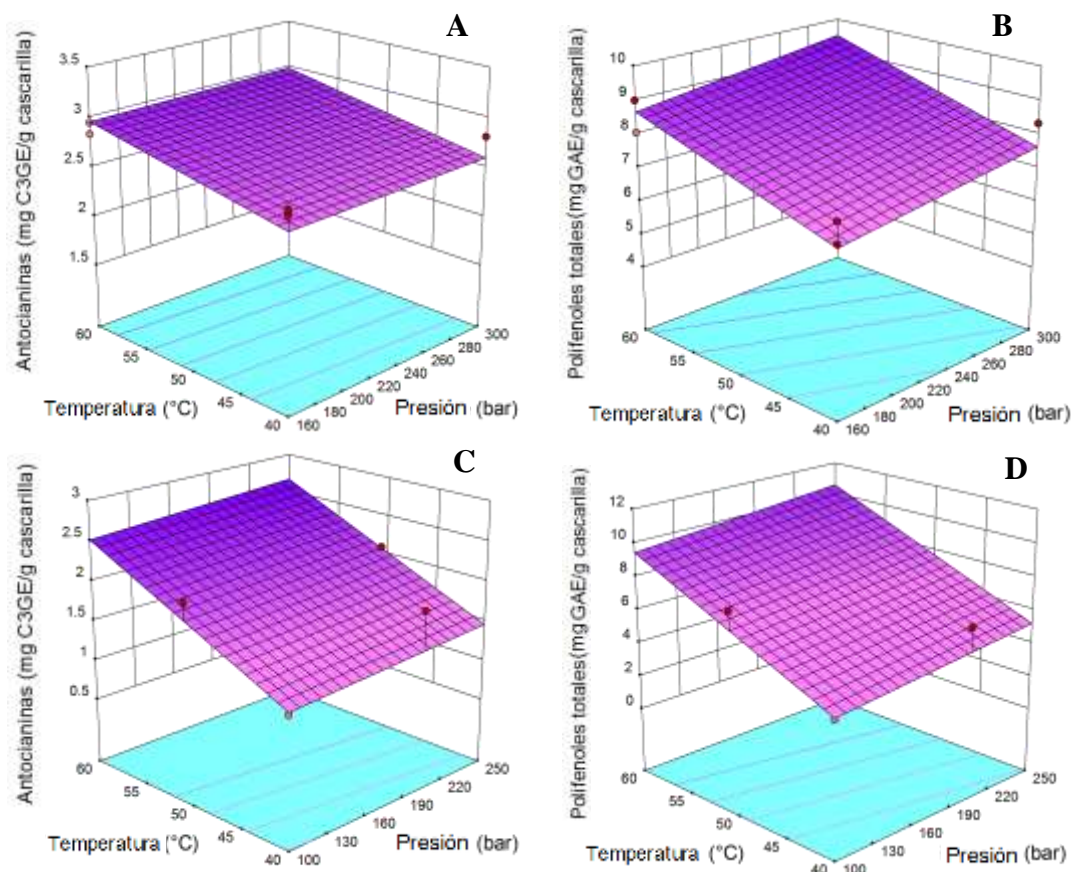


Figura 17. Gráficos de superficie de respuesta del modelo cuadrático para antocianinas (A) y polifenoles totales (B) obtenidos por SFE, y antocianinas (C) y polifenoles totales (D) recuperadas por PLE. Figuras generadas con el software Design-Expert®. Solvente: Etanol – Agua 50%. Colores más oscuros indican una mayor concentración.

Para SFE, la Tabla 4 muestra las condiciones experimentales empleadas y el rendimiento de antocianinas y TPC. Como en el caso de PLE, solo la combinación de temperatura y co-solvente tuvo un impacto significativo en el rendimiento de extracción (Figura 17, C y D). Las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas con SFE fueron 300 bar, 60°C y como co-solvente etanol-agua 50% v/v, registrando concentraciones de antocianinas de 3.34 mg C3GE/g cascarilla y TPC de 9.67 mg GAE/g cascarilla.

Tabla 4. Matriz de diseño experimental D-optimal para la extracción con fluido supercrítico

Corrida	Presión	Temperatura	Co-solvente	Antocianinas (mg C3GE/g cascarilla)	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g cascarilla)
1	300	60	H ₂ O acidificada	3.15±0.02 ^a	8.81±0.26 ^b
2	200	40	H ₂ O acidificada	2.48±0.05 ^g	5.56±0.01 ^{jk}
3	160	40	EtOH-H ₂ O 50%	2.72±0.03 ^{de}	7.54±0.16 ^e
4	160	60	EtOH-H ₂ O 10%	2.29±0.07 ^h	6.00±0.18 ^{hi}
5	300	60	EtOH-H ₂ O 50%	2.73±0.04 ^{de}	8.63±0.16 ^{bc}
6	200	60	H ₂ O acidificada	2.63±0.009 ^{efg}	6.67±0.02 ^{fg}
7	300	40	EtOH-H ₂ O 10%	1.98±0.02 ^{jk}	5.21±0.03 ^{kl}
8	160	40	EtOH-H ₂ O 50%	2.78±0.006 ^{de}	6.93±0.13 ^f
9	160	60	EtOH-H ₂ O 50%	2.84±0.01 ^{cd}	9.00±0.04 ^b
10	160	50	H ₂ O acidificada	2.76±0.08 ^{de}	6.11±0.07 ^h
11	300	50	H ₂ O acidificada	2.26±0.05 ^{hi}	5.49±0.04 ^{jk}
12	300	40	EtOH-H ₂ O 50%	2.81±0.06 ^{cd}	8.33±0.05 ^{cd}
13	160	40	EtOH-H ₂ O 10%	2.11±0.02 ^{ij}	5.48±0.15 ^{jk}
14	300	60	EtOH-H ₂ O 10%	3.00±0.02 ^{ab}	9.67±0.07 ^a
15	300	50	EtOH-H ₂ O 10%	2.25±0.01 ^{hi}	6.99±0.12 ^f
16	160	60	EtOH-H ₂ O 50%	2.95±0.12 ^{bc}	8.06±0.12 ^d
17	160	60	EtOH-H ₂ O 10%	2.08±0.04 ⁱ	6.32±0.05 ^{gh}
18	160	50	H ₂ O acidificada	2.30±0.03 ^h	5.67±0.08 ^{ij}
19	300	40	H ₂ O acidificada	1.79±0.04 ^l	4.32±0.13 ^m
20	200	50	EtOH-H ₂ O 10%	2.56±0.05 ^{fg}	6.77±0.14 ^f
21	160	40	EtOH-H ₂ O 10%	1.91±0.04 ^{kl}	5.04±0.07 ^l
22	300	50	EtOH-H ₂ O 50%	2.65±0.01 ^{ef}	8.24±0.04 ^d

EtOH: etanol, H₂O: agua, C3GE: equivalentes de cianidina 3-glucósido, GAE: equivalentes de ácido gálico. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una columna ($p < 0.05$, análisis post hoc de Tukey HSD).

Los incrementos en la temperatura de extracción favorecen la liberación de compuestos fenólicos. Esto se debe a que las altas temperaturas permiten una mejor penetración del solvente en la matriz y una mayor solubilidad de los compuestos fenólicos en el solvente al reducir la viscosidad y la tensión superficial (Espada-Bellido et al. 2018; Garcia-Mendoza et al. 2017; Kühn y Temelli 2017; Maran, Priya, y Manikandan 2014). En este trabajo, se consideraron temperaturas moderadas para evitar la degradación de las antocianinas, los cuales son termolábiles. Un aumento adicional de la temperatura (>60–70°C) disminuiría la recuperación de compuestos bioactivos debido a la descomposición de componentes volátiles y a la reducción de la densidad de CO₂ (Espada-Bellido et al. 2018; Maran, Priya, y Manikandan 2014).

Para las mezclas de los co-solventes, la combinación de agua y etanol fue la adecuada para la extracción de antocianinas, pero podría ser diferente para la recuperación de otros compuestos fenólicos. Un aumento en la concentración de

etanol mejoró las recuperaciones de antocianinas debido a una mayor capacidad del etanol para formar enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con fenoles, dando como resultado una mayor capacidad de disolución de los compuestos fenólicos en el co-solvente (Kühn y Temelli 2017; Paes et al. 2014). Por otra parte, la adición de agua en la recuperación de antocianinas y otros compuestos fenólicos reviste gran interés debido a que la solubilidad de las antocianinas aumenta en soluciones acuosas. Además, la formación de ácido carbónico por la solubilización de CO₂ disminuye el pH del solvente. A pH bajo, las antocianinas están predominantemente presentes en su forma de catión flavilio, haciéndolas más hidrofílicas, lo que facilita su extracción (Maran, Priya, y Manikandan 2014). Por lo tanto, el etanol puede mejorar la solubilidad de las antocianinas mientras que el agua contribuye a la desorción del soluto de la matriz (Machado et al. 2015). Esto explica por qué la mayor recuperación de antocianinas se obtuvo con EtOH–H₂O 50% v/v en lugar de EtOH–H₂O 70% v/v, EtOH–H₂O 10% v/v o agua acidificada. Además, se ha reportado que las combinaciones de CO₂, etanol y agua son eficientes para extraer antocianinas de moras azules, saúco y arándanos (Kühn y Temelli 2017; Paes et al. 2014).

En este trabajo no hubo un efecto significativo de la presión dentro de los rangos estudiados para la extracción de antocianinas. Estos hallazgos están de acuerdo con (Kühn y Temelli 2017). Cabe destacar que el rendimiento de extracción mejora por la presencia de presión, debido a que fortalece la interacción entre el solvente y la matriz al aumentar la densidad del fluido y disminuir la distancia entre las moléculas (Maran, Priya, y Manikandan 2014).

La acidificación del co-solvente también aumenta la eficiencia de la recuperación de antocianinas. Los co-solventes de pH bajo pueden aumentar significativamente el rendimiento de antocianinas y otros compuestos fenólicos debido al rompimiento de las membranas celulares, los enlaces moleculares de azúcar, acilo, arilo y alquilo, y de este modo mejorar la liberación de fenoles de bajo peso molecular y otros compuestos (Garcia-Mendoza et al. 2017; Machado et al. 2015; Rocha et al. 2017; Paes et al. 2014). Sin embargo, la alta concentración de ácido cítrico en

extractos ricos en antocianinas podría afectar negativamente la integridad de los compuestos de interés (Alcázar-Alay et al. 2017).

8.3 Comparación entre métodos de extracción convencionales y alternativos

En base a los resultados de los experimentos de PLE y SFE, se realizaron extracciones de antocianinas en sus respectivos puntos óptimos para compararlo con la extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente (LEA-M) y el frijol negro triturado (LEA-WB). LEA-WB se empleó con el fin de conocer qué impacto tendría la extracción del frijol completo sobre las antocianinas.

Como se muestra en la Tabla 5, las concentraciones de antocianinas obtenidas por SFE, PLE y LEA-M fueron las más altas y estadísticamente iguales ($p < 0.05$), mientras que LEA-WB obtuvo la concentración más baja.

Tabla 5. Antocianinas y compuestos fenólicos totales a partir de diferentes métodos de extracción.

Método de extracción	Antocianinas	Compuestos fenólicos totales
	mg C3GE/g cascarilla	mg GAE/g cascarilla
PLE	2.26±0.34 ^a	7.05±1.32 ^{bc}
SFE	2.64±0.53 ^a	11.09±2.43 ^a
LEA-M	2.43±0.07 ^a	8.92±0.3 ^{ab}
LEA-WB	1.26±0.05 ^b	3.15±0.26 ^d

PLE: extracción con líquidos presurizados, SFE: extracción con fluidos supercríticos, LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, LEA-WB: extracción por lixiviación del frijol negro triturado, C3GE: equivalentes de cianidina 3-glucósido, GAE: equivalentes de ácido gálico. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una columna en $p < 0.05$ (análisis post hoc de Tukey HSD).

Con respecto a los compuestos fenólicos totales, la concentración más alta registrada fue a través de SFE con 11.09 mg de GAE/g cascarilla seguido de LEA-M con 8.92. Similar al caso de las antocianinas, la concentración más baja de TPC se encontró en LEA-WB. La pérdida de antocianinas y otros compuestos fenólicos en LEA-WB puede deberse a la interacción de los flavonoides con las proteínas del cotiledón. Esta interacción no solo afecta la disponibilidad de antocianinas, sino que también tiene una influencia negativa en la bioactividad y el potencial antioxidante de las antocianinas debido a la pérdida de grupos hidroxilo tras la interacción covalente/no

covalente entre flavonoides y proteínas (Yeo y Shahidi 2019). Aunque las concentraciones de antocianinas fueron estadísticamente iguales para LEA-M, SFE y PLE, los métodos alternativos pueden ofrecer ventajas importantes (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla comparativa entre el método de extracción convencional y alternativa.

Método	Tiempo requerido para procesar 50 gramos de frijol común		
	Convencional (Lixiviación)	Alternativa (SFE)	Alternativa (PLE)
Descascarillado	8 hrs	No requiere	No requiere
Triturado	30 min	procesamiento de la	procesamiento de la
Tamizado	30 min	muestra	muestra
Extracción	15 min	1 hrs	15 min
Centrifugación	15 min	No aplica	No aplica
		Otras ventajas	
Cantidad de solvente	Alto (212 mL)	Bajo (95 mL)	Alto (212 mL)
Tipo de solvente	Etanol y ácido clorhídrico	Etanol y agua	Etanol y agua
Recuperación de cotiledón	Sí	Sí	Sí

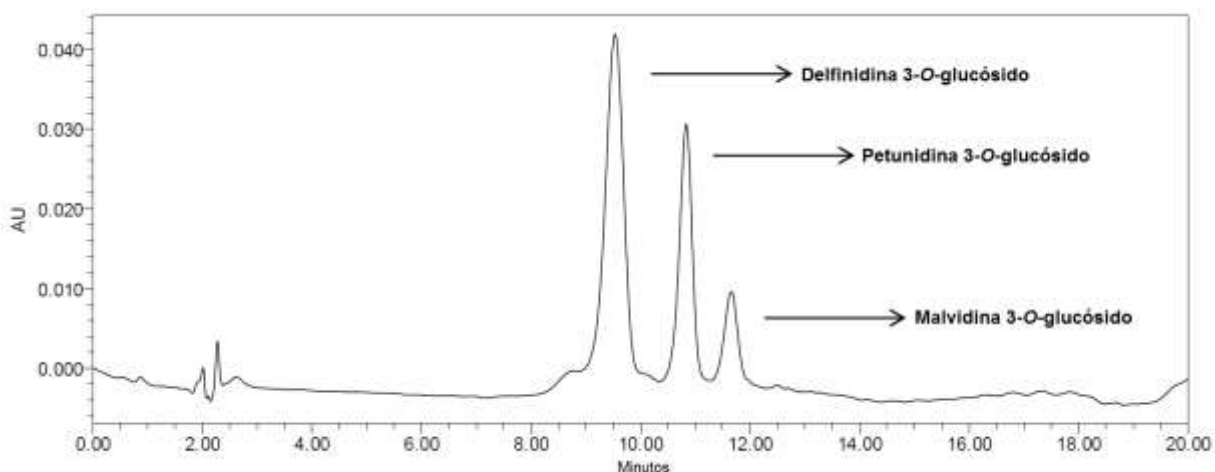
SFE: Extracción con fluidos supercríticos, PLE: Extracción con líquidos presurizados, hrs: horas, min: minutos.

A diferencia de LEA-M, SFE y PLE no requieren procesamiento de muestras como el descascarillado y triturado, lo cual permite realizar extracciones más rápidas. Además, el solvente utilizado para la extracción de antocianinas con estas técnicas son solventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros) (Machado et al. 2015). Usando métodos alternativos, sería posible extraer compuestos fenólicos ligados-insolubles que podrían mejorar la estabilidad de las antocianinas a través de la co-pigmentación (Aguilera et al. 2016; Khoo et al. 2017). Además, el remanente del frijol extraído se podría usar como ingrediente alimentario por su contenido de proteínas y carbohidratos. Sin embargo, el SFE puede ser un método de extracción aún más prometedor que el PLE, ya que reduce significativamente el consumo de solventes, como se muestra en la Tabla 6. Además, se ha reportado que el SFE es un método más selectivo que PLE para la extracción de antocianinas (García-Mendoza et al. 2017).

8.4 Antocianinas del frijol negro variedad San Luis

Tres antocianinas fueron identificados a través de UHPLC: petunidina 3-O-glucósido, delphinidina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-glucósido, las cuales fueron detectadas en todas las muestras. La delphinidina 3-O-glucósido es la antocianina con la mayor

proporción, seguida de petunidina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-glucósido, con una intensidad relativa de 58.37%, 30.92% y 10.69%, respectivamente (Figura 18). Cabe mencionar que la proporción de las tres antocianinas en cada uno de los extractos analizados por los diferentes métodos (SFE, PLE, LEA-M y LEA-WB) fueron estadísticamente similar ($p < 0.05$). Aunque pelargonidina 3-O-glucósido y cianidina 3-O-glucósido son antocianinas que han sido reportadas en el frijol negro, estas no fueron detectadas en las muestras analizadas (Yang et al. 2018).



Antocianina	Tiempo de retención (min)	% intensidad relativa
Delphinidina 3-O-glucósido	9.488	58.37±0.24
Petunidina 3-O-glucósido	10.806	30.92±0.40
Malvidina 3-O-glucósido	11.635	10.69±0.22

Figura 18. Cromatograma UHPLC representativo de los extractos de antocianinas y el porcentaje de intensidad relativa (absorbancia a 520 nm). Los resultados se muestran en media \pm desviación estándar.

Las antocianinas detectadas ya han sido previamente reportadas en otras variedades de frijol negro (Mojica et al. 2015; Yang et al. 2018). La composición química del frijol puede ser influido por varios factores, tales como condiciones ambientales, variedad, almacenamiento y métodos de procesamiento. Generalmente el método de procesamiento tiene la mayor influencia en la alteración de la composición (Yang et al. 2018). En este estudio, la proporción de las tres antocianinas es la misma independientemente del tipo de solvente utilizado, lo que sugiere que el perfil de antocianinas podría depender más de la variedad que del método de extracción. Otra posibilidad es que, debido al ajuste de pH de los solventes, la

extracción pudo haber sido selectiva a las antocianinas afines a ese rango específico de pH, generando así perfiles de antocianinas iguales.

8.5 Compuestos fenólicos no coloreados en el frijol común variedad San Luis

Se identificaron once compuestos fenólicos no coloreados en los extractos ricos en antocianinas mediante UPLC-QToF-MS/MS (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis cualitativo de los extractos obtenido por diferentes métodos.

Compuesto	t _R (min)	m/z	% intensidad relativa			
			LEA-M	LEA-WB	SFE	PLE
Catequina	0.770	289.1659	15.78	1.12	6.40	1.93
Ácido clorogénico	0.779	353.1818	0.29	1.56	13.52	16.28
Ácido ferúlico	0.802	191.1480	1.66	1.84	4.41	6.90
Ácido gálico*	3.693	169.1064	0.10	0.14	1.97	0.15
Ácido siríngico	3.806	197.9050	38.65	8.44	11.85	25.04
Miricetina-3-O-glucosido*	4.295	479.1749	2.25	0.84	2.87	5.20
Ácido p-cumárico	4.343	119.1335	0.46	1.85	0.29	0.93
Hidrato de rutina	4.642	609.2362	1.07	39.40	9.25	9.22
Miricetina	5.515	317.1280	18.06	3.35	4.92	4.54
Quercetina	6.229	301.1333	7.51	1.56	2.61	2.25
Kaempferol	7.311	285.1339	7.08	1.51	3.15	4.05
Otros	-	-	7.09	38.39	38.75	23.50

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, LEA-WB: extracción por lixiviación del frijol negro triturado, SFE: extracción con fluidos supercríticos, PLE: extracción con líquidos presurizados. Los resultados se expresan como % del área total, representando la abundancia relativa de un pico específico relacionado con la suma de las áreas de todos los picos identificados en el cromatograma para cada método de extracción. Los valores m/z están relacionados con la ionización negativa. Los compuestos con el símbolo * se identificaron solo con valores m/z, mientras que los compuestos sin el símbolo se identificaron con valores m/z y estándares puros.

La identificación de los compuestos se basó en el tiempo de retención y la masa monoisotópica de los estándares puros correspondientes a los metabolitos de interés. La catequina, el ácido siríngico y la miricetina fueron los principales compuestos fenólicos detectados en el extracto por LEA-M, mientras que en LEA-WB, además de los compuestos antes mencionados, se detectó hidrato de rutina. Por otra parte, los métodos de extracción alternativos (SFE y PLE) se detectó como principales compuestos fenólicos el ácido clorogénico, ácido siríngico, hidrato de rutina, miricetina, quercetina, kaempferol y ácido ferúlico, esto debido a los diferentes métodos de extracción utilizados.

8.6 Estabilidad de los extractos ricos en antocianinas

La estabilidad del extracto recuperado por CO₂ supercrítico (SFE) se evaluó utilizando el extracto obtenido de la cascarilla de frijol por lixiviación (LEA-M) como control. SFE fue elegido como el método alternativo de elección debido a su rendimiento de TPC y la baja cantidad requerida de solvente. LEA-M fue elegida como la extracción convencional de control por su rendimiento de antocianinas.

8.6.1 Efecto de la exposición a la luz

La degradación de la antocianina bajo diferentes condiciones de luz se puede observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto de la luz sobre los extractos ricos en antocianinas. Tasa de degradación y tiempo de vida media de las antocianinas en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días.

Parámetro	Condición	Antocianinas	
		Por LEA-M	Por SFE
Tasa (k, d ⁻¹)	Luz	0.0401±0.001 ^{aB}	0.1297±0.006 ^{aA}
	Oscuridad	0.0221±9·10 ⁻⁴ ^{bB}	0.0824±0.001 ^{bA}
Vida media (t _{1/2} , d)	Luz	17.28±0.622 ^{bA}	5.34±0.27 ^{bB}
	Oscuridad	31.35±1.305 ^{aA}	8.40±0.12 ^{aB}
Coeficiente de regresión, R ²	Luz	0.95	0.99
	Oscuridad	0.94	0.99

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos, d: días. Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas dentro de la misma muestra bajo condiciones de luz distintas, mientras que las letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre las muestras bajo la misma condición de luz (p<0.05, prueba t de dos muestras). Los resultados se muestran en media ± error estándar.

Como se esperaba, la degradación de estos compuestos fue menor en condiciones oscuras para ambas soluciones. Los valores de la constante de velocidad de degradación (k) disminuyeron en ambas soluciones de antocianinas, siendo el k más bajo 0.0221 d⁻¹ para la solución de antocianinas por lixiviación en oscuridad. Las antocianinas extraídas por lixiviación fueron menos susceptibles a la degradación de la luz en comparación con las recuperadas por SFE, registrando valores de vida media más bajos (t_{1/2}). Además, para condiciones de oscuridad, se obtuvo t_{1/2} de 17.28 días para la solución de antocianina por LEA-M, mientras que para el obtenido por SFE fue de 5.34 días, que es tres veces menor. A pesar de que la degradación de las antocianinas fue mayor en el extracto de SFE que en LEA-M, la degradación (k y t_{1/2})

de los compuestos fenólicos totales fue estadísticamente igual ($p < 0.05$), ya sea en condiciones de oscuridad o de luz (Tabla 9).

Tabla 9. Cinética de reacción de primer orden para compuestos fenólicos totales (A) y color a^* (B) de extractos en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días.









		Compuestos fenólicos totales			
(A)	Parámetro	Condición	Por LEA-M	Por SFE	
	Tasa (k, d^{-1})	Luz	0.0162 ± 0.002^{aA}	0.0210 ± 0.0002^{aA}	
		Oscuridad	0.0090 ± 0.002^{aA}	$0.0167 \pm 1 \cdot 10^{-4bA}$	
	Vida media ($t_{1/2}$, d)	Luz	44.09 ± 5.587^{aA}	33.01 ± 0.455^{bA}	
		Oscuridad	89.37 ± 24.073^{aA}	41.31 ± 0.353^{aA}	
	Coefficiente de regresión, R^2	Luz	0.99	0.95	
		Oscuridad	0.98	0.93	

		Color a^*			
(B)	Parámetro	Condición	Por LEA-M	Por SFE	
	Tasa (k, d^{-1})	Luz	$0.0349 \pm 5 \cdot 10^{-4}^{aB}$	$0.0866 \pm 2 \cdot 10^{-4aA}$	
		Oscuridad	$0.0202 \pm 7 \cdot 10^{-5}^{bB}$	$0.0487 \pm 4 \cdot 10^{-4bA}$	
	Vida media ($t_{1/2}$, d)	Luz	19.82 ± 0.322^{bA}	7.99 ± 0.024^{bB}	
		Oscuridad	34.25 ± 0.118^{aA}	14.22 ± 0.141^{aB}	
	Coefficiente de regresión, R^2	Luz	0.99	0.99	
		Oscuridad	0.99	0.99	

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos, d: días. Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas dentro de la misma muestra bajo condiciones de luz distintas, mientras que las letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre las muestras bajo la misma condición de luz ($p < 0.05$, prueba t de dos muestras). Los resultados se muestran en media \pm error estándar.

Como se puede ver en la Tabla 10, los parámetros de color están estrechamente correlacionados con los parámetros de degradación de antocianinas.

Tabla 10. Efecto de la luz sobre los extractos ricos en antocianinas. Cambio en los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de las antocianinas en condiciones de luz y oscuridad después de 10 días.

Método	Condición	L^*		a^*		b^*		Color	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
LEA-M	Luz	91.13	91.94	18.48	13.02	0.37	3.29		
	Oscuridad	91.13	91.36	18.48	15.09	0.37	1.64		
SFE	Luz	90.9	95.15	18.98	7.98	-0.67	2.53		
	Oscuridad	90.9	93.48	18.98	11.66	-0.67	1.73		

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos.

La luminosidad (L^*) de la solución de antocianina de LEA-M exhibió un comportamiento estable, mostrando poca diferencia entre los valores de L^* . Sin embargo, las soluciones de SFE aumentaron su L^* , de 90.9 a 95.15 en condiciones de luz y de 90.9 a 93.48 en condiciones de oscuridad, lo que sugiere un desvanecimiento

del color. El parámetro de color a^* está asociado al rojo y verde en la coordenada de cromaticidad. Los valores positivos de a^* indican color rojo mientras que los valores negativos indican color verde. El valor de a^* en todas las soluciones disminuyó con el tiempo (Tabla 10), pero las soluciones de LEA-M fueron más estables que las de SFE, por lo que registraron los valores k y $t_{1/2}$ más bajos de a^* (Tabla 9). Además, el efecto de la exposición a la luz sobre el cambio de color (ΔE^*) de LEA-M y SFE se puede ver en la Figura 19.

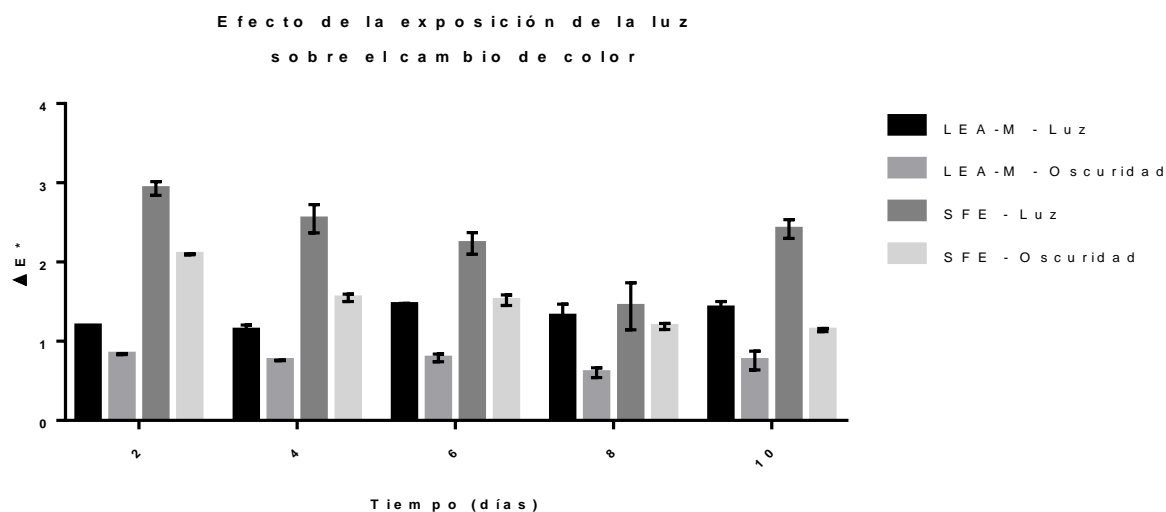


Figura 19. Efecto de la exposición a la luz sobre la diferencia de color (ΔE^*) del extracto rico en antocianinas de LEA-M y SFE. Los resultados se muestran en media \pm error estándar. LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos.

Los extractos de SFE mostraron un valor de ΔE^* más alto que LEA-M, lo que sugiere una degradación más rápida del extracto. Estos resultados están correlacionados con los datos de las Tablas 8, 9 y 10. La pérdida del color rojo se debe principalmente a la degradación de las antocianinas. La degradación es causada probablemente debido a la oxidación y rompimiento de los enlaces covalentes de las antocianinas, lo que conduce a la generación de moléculas más pequeñas incoloras (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017).

La estabilidad de las antocianinas depende del tipo de antocianina, el fenómeno de la co-pigmentación y los otros compuestos fenólicos que pueden estar presentes. Hay antocianinas que son más susceptibles a la degradación que otras antocianinas

debido a sus diferencias estructurales (L. Fan et al. 2019). Se ha reportado que las estructuras químicas de los co-pigmentos son fundamentales para que puedan llevarse a cabo las interacciones de co-pigmentación (L. Fan et al. 2019; Maciel et al. 2018). El número de electrones deslocalizados y la conformación estructural que puede adoptar una molécula podrían determinar su eficacia como co-pigmento (Trouillas et al. 2016). En este sentido, las moléculas con grandes sistemas π y flexibilidad geométrica podrían permitir una formación más eficiente de interacciones moleculares entre el pigmento y el co-pigmento, por lo que no sorprende que los ácidos hidroxicinámicos puedan actuar como mejores pigmentos que los ácidos hidroxibenzoicos (Klisurova et al. 2019; Trouillas et al. 2016).

Por consiguiente, debido a los diferentes perfiles químicos de los extractos, SFE probablemente pudo haber recuperado compuestos fenólicos que no pueden actuar eficientemente como co-pigmentos debido a sus propias limitaciones estructurales, mientras que LEA-M podría haber extraído compuestos que pueden formar fácilmente interacciones de acoplamiento π - π .

8.6.2 Efecto del almacenamiento

El coeficiente de regresión indicó que la degradación de las soluciones de antocianinas de SFE y LEA-M siguieron una cinética de reacción de primer orden a 4°C, 25°C y 32°C (Figura 20).

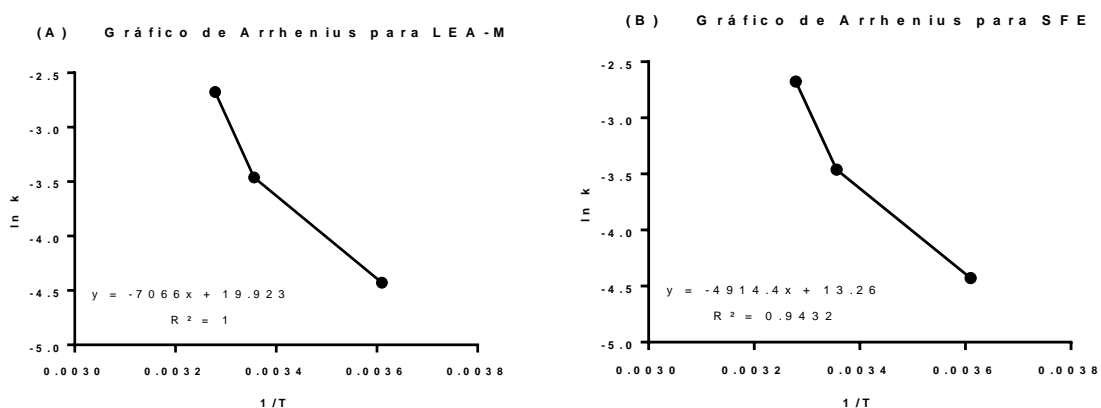


Figura 20. Gráfico de Arrhenius de antocianinas a diferentes temperaturas para la extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente LEA-M (A) y la extracción con fluidos supercríticos SFE (B). k : tasa de degradación, T : temperatura, R^2 : coeficiente de regresión.

Como se muestra en la Tabla 11, los valores más bajos de k se encontraron en muestras almacenadas a 4°C, pero no se observaron diferencias estadísticas entre la solución de antocianinas por LEA-M y SFE para cada temperatura de almacenamiento.

Tabla 11. Efecto del almacenamiento sobre los extractos ricos en antocianinas. Tasa de degradación, tiempo de vida media y energía de activación de las antocianinas a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas.

Parámetro	Temperatura	Antocianinas	
		Por LEA-M	Por SFE
Tasa (k, d ⁻¹)	4°C	0.0038±5·10 ⁻⁴ b ^A	0.0119±9·10 ⁻⁴ c ^A
	25°C	0.0226±0.0027 ab ^A	0.0306±5·10 ⁻⁴ b ^A
	32°C	0.0388±0.0028 a ^A	0.0688±0.0013 a ^A
Vida media (t _{1/2} , d)	4°C	188.29±25.65 a ^A	57.83±4.37 a ^A
	25°C	30.62±3.71 b ^A	22.63±0.384 b ^A
	32°C	17.81±1.31 b ^A	10.07±0.189 c ^A
Q ₁₀	(4 – 25°C)	2.3546±0.046 a ^A	1.8093±0.040 a ^B
	(25 – 32°C)	2.1765±0.038 a ^A	1.7134±0.034 a ^B
Energía de activación, Ea (kJ/mol)		58.7467±1.34 ^A	40.6617±1.53 ^B
Coeficiente de regresión, R ²		0.99	0.99

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos, d: días, Q₁₀: cambio en la constante de velocidad de reacción para 10°C. Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas dentro de la misma muestra bajo condiciones de luz distintas, mientras que las letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre las muestras bajo la misma condición de luz (p<0.05, prueba t de dos muestras). Los resultados se muestran en media ± error estándar.

Para t_{1/2}, los valores más altos se encontraron en muestras almacenadas a 4°C y en el mismo caso que k, sin diferencias estadísticas entre LEA-M y SFE para cada temperatura. Sin embargo, los valores de k para TPC en muestras de SFE fueron más altos que LEA-M, lo que sugiere una degradación más rápida (Tabla 12).

Tabla 12. Cinética de reacción de primer orden y parámetros de Arrhenius para compuestos fenólicos totales (A) y color a* (B) de extractos a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas.

		Compuestos fenólicos totales		
(A)	Parámetro	Temperatura	Por LEA-M	Por SFE
	Tasa (k, d⁻¹)	4°C	0.0031±1·10 ⁻⁴ bB	0.0061±2·10 ⁻⁴ aA
		25°C	0.0051±6·10 ⁻⁵ aB	0.0060±1·10 ⁻⁴ aA
		32°C	0.0061±1·10 ⁻⁴ aA	0.0110±0.0015 ^{aA}
	Vida media (t_{1/2}, d)	4°C	224.71±12.92 ^{aB}	113.80±3.90 ^{aA}
		25°C	133.82±1.52 ^{bB}	114.09±2.11 ^{aA}
		32°C	113.72±2.87 ^{bA}	65.07±8.96 ^{bA}
	Q₁₀	(4 – 25°C)	1.2817±0.039 ^{aA}	1.2398±0.078 ^{aA}
		(25 – 32°C)	1.2527±0.035 ^{aA}	1.2151±0.070 ^{aA}
	Energía de activación, Ea (kJ/mol)		16.63±2.12 ^A	14.47±4.36 ^A
	Coeficiente de regresión, R²		0.99	0.99

		Color a*		
(B)	Parámetro	Temperatura	Por LEA-M	Por SFE
	Tasa (k, d⁻¹)	4°C	0.0011±3·10 ⁻⁵ cB	0.0053±5·10 ⁻⁵ cA
		25°C	0.0094±1·10 ⁻⁵ bB	0.0222±7·10 ⁻⁵ bA
		32°C	0.0194±5·10 ⁻⁵ aB	0.0369±1·10 ⁻⁴ aA
	Vida media (t_{1/2}, d)	4°C	580.68±16.28 ^{aA}	128.99±1.20 ^{aB}
		25°C	73.55±1.52 ^{bA}	31.13±0.094 ^{bB}
		32°C	35.69±0.094 ^{bA}	18.77±0.095 ^{cB}
	Q₁₀	(4 – 25°C)	2.74±0.031 ^{aA}	2.09±0.010 ^{aB}
		(25 – 32°C)	2.50±0.026 ^{aA}	1.88±0.009 ^{bB}
	Energía de activación, Ea (kJ/mol)		69.33±0.795 ^A	47.87±0.371 ^B
	Coeficiente de regresión, R²		0.99	0.99

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos, d: días, Q₁₀: cambio en la constante de velocidad de reacción para 10°C. Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas dentro de la misma muestra bajo condiciones de luz distintas, mientras que las letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre las muestras bajo la misma condición de luz (p<0.05, prueba t de dos muestras). Los resultados se muestran en media ± error estándar.













Como se esperaba, la constante de degradación aumenta a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento, por lo que la conservación de la antocianina resulta mejor a temperaturas más bajas. La temperatura es un factor que afecta la estabilidad de las antocianinas. La degradación puede ocurrir por dos mecanismos, la apertura hidrolítica del anillo heterocíclico, que conduce a la formación de calcona incolora y la hidrólisis del 3-glucósido para formar la aglicona inestable (Machado et al. 2015).

Q₁₀ indica el cambio en la constante de velocidad de reacción para 10°C, cuanto mayor sea el valor, más dependiente de la temperatura será la reacción (Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017). La solución por LEA-M exhibió una reacción más

dependiente de la temperatura, mientras que la solución por SFE tuvo valores más bajos de Q_{10} ($p < 0.05$). Sin embargo, se puede ver que la solución LEA-M tiene una E_a más alta que la solución SFE. El valor E_a indica la energía que necesita la reacción de degradación. Cuanto mayor es el valor, más estable es la antocianina (L. Fan et al. 2019; Mojica, Berhow, y Gonzalez de Mejia 2017).

El efecto del almacenamiento en los parámetros de color de las soluciones de antocianinas se puede ver en la Tabla 13.

Tabla 13. Efecto del almacenamiento sobre los extractos ricos en antocianinas. Cambios en los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de las antocianinas a 4°C, 25°C y 32°C después de seis semanas.

Método de extracción	Temperatura	L^*		a^*		b^*		Color	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
LEA-M	4°C	91.13	90.52	18.48	17.57	0.37	-0.07		
	25°C	91.13	91.77	18.48	12.44	0.37	3.22		
	32°C	91.13	93.12	18.48	8.17	0.37	6.46		
SFE	4°C	90.9	92.15	18.98	15.14	-0.67	0.13		
	25°C	90.9	94.98	18.98	7.45	-0.67	2.72		
	32°C	90.9	96.58	18.98	4.02	-0.67	3.66		

LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos.

En general, cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento, menor es el valor de a^* , por lo que el color es más estable a una temperatura más baja. La variación en los valores de L^* y a^* fueron mayor en la solución SFE que en la solución LEA-M. Además, esos resultados están correlacionados con la Figura 21, donde se puede ver el efecto del almacenamiento sobre los valores de ΔE^* de los extractos de LEA-M y SFE. Las soluciones SFE mostraron un valor de ΔE^* más alto que LEA-M en todas las temperaturas evaluadas, lo que sugiere una degradación más rápida del extracto.

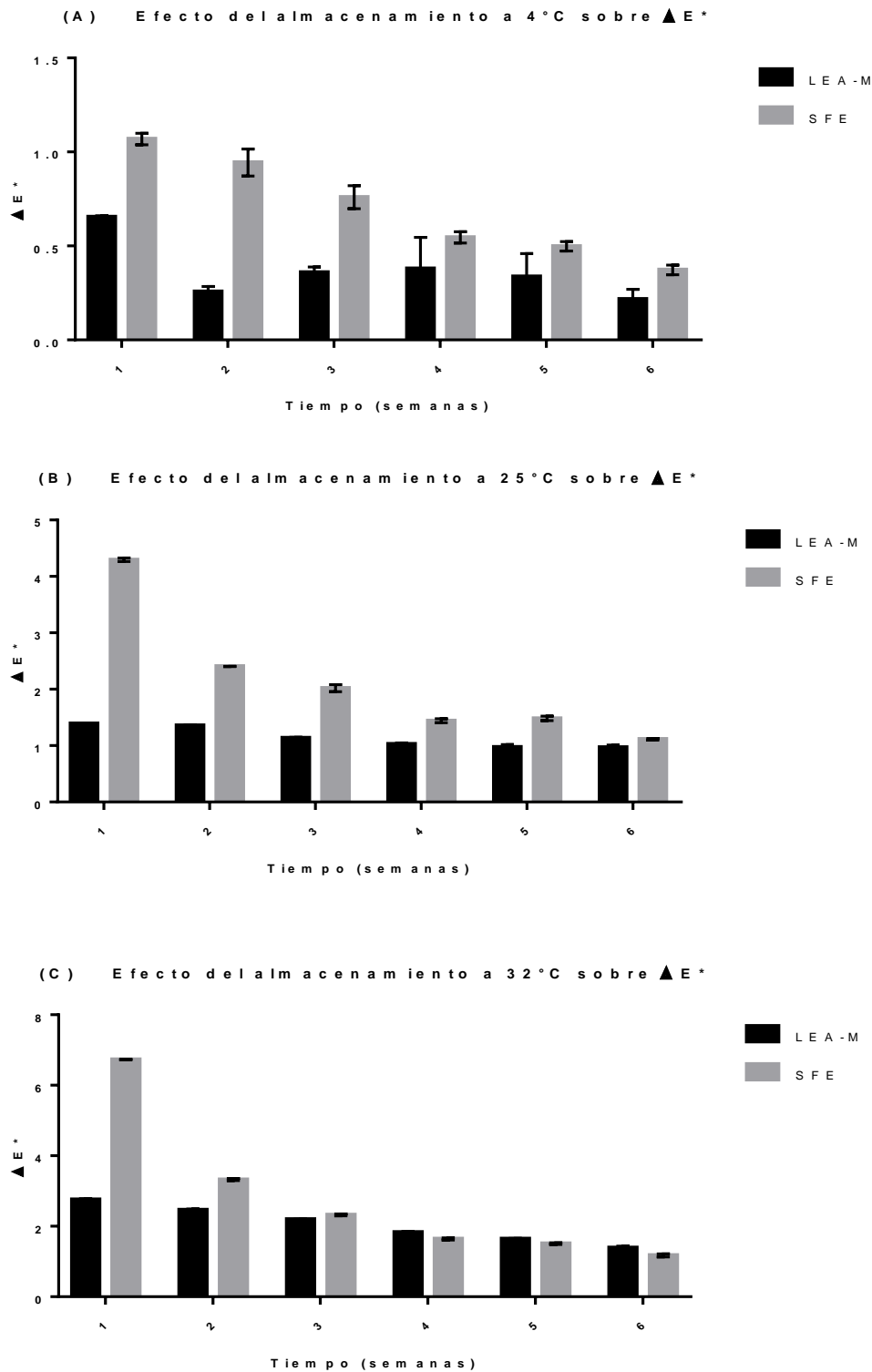


Figura 21. Efecto del almacenamiento de temperatura sobre la diferencia de color (ΔE^*) del extracto rico en antocianinas de LEA-M y SFE. (A): 4°C. (B): 25°C, (C): 32°C. Los resultados se muestran en media \pm error estándar. LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, SFE: extracción con fluidos supercríticos.

A pesar de que no hubo diferencias estadísticas de k y $t_{1/2}$ entre ambas soluciones, los valores de E_a , ΔE^* y a^* sugieren una estabilidad ligeramente mayor de las antocianinas extraídas por lixiviación. Como no se agregan otras moléculas que pudieran actuar como co-pigmento, la estabilidad de las antocianinas depende principalmente de la interacción con los otros compuestos fenólicos que podrían haberse extraído con los respectivos métodos. Por lo tanto, ciertas moléculas presentes en el extracto de LEA-M podrían co-pigmentarse más eficientemente que las recuperadas con SFE (Klisurova et al. 2019).

LEA-M extrajo una alta proporción de ácido siríngico y catequina, que son moléculas consideradas como buenos co-pigmentos. Se ha reportado que estos compuestos son mejores co-pigmentos que otros compuestos fenólicos como el ácido gálico, el ácido clorogénico y la epicatequina (Klisurova et al. 2019). Por consiguiente, la presencia de una alta proporción de co-pigmentos eficientes en el extracto por lixiviación podría haber preservado la estabilidad de la antocianina de una mejor manera que el SFE. Los compuestos fenólicos recuperados por SFE podrían ser más susceptibles a la degradación, limitando el efecto de la co-pigmentación, sin embargo, algunas de estas moléculas podrían ser aquellas que ejercen un importante potencial biológico.

8.7 Potencial biológico de los extractos ricos en antocianinas

8.7.1 Potencial antidiabetes

Las antocianinas y otros compuestos fenólicos recuperados por SFE y PLE mostraron la mayor capacidad para inhibir las tres enzimas, a diferencia de LEA-M y LEA-WB, que solo inhibieron α -glucosidasa y DPP-IV o α -amilasa, respectivamente (Figura 22, A - C).

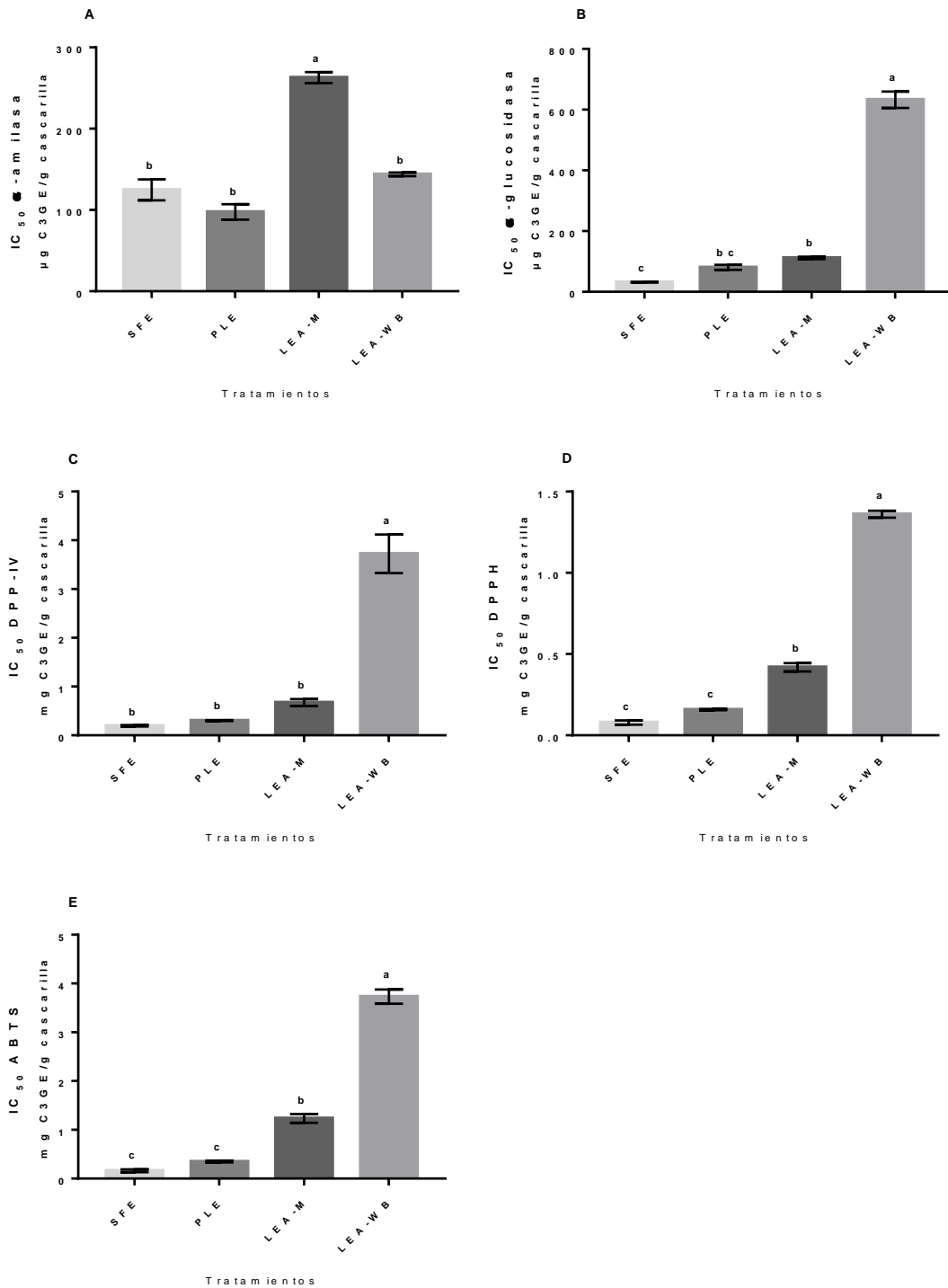


Figura 22. Potencial biológico del extracto rico en antocianinas recuperado a través diferentes métodos. Concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) de α-amilasa (A), α-glucosidasa (B), DPP-IV (C), DPPH (D) y ABTS (E). PLE: extracción con líquidos presurizados, SFE: extracción con fluidos supercríticos, LEA-M: extracción por lixiviación de la cascarilla descascarillada manualmente, LEA-WB: extracción por lixiviación del frijol negro triturado, C3GE: equivalentes de cianidina 3-glucósido. Los resultados se muestran en media ± error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras a p<0.05 (análisis post hoc de Tukey HSD).

Los extractos de SFE y PLE registraron los valores más bajos de IC_{50} , el cual es la concentración de inhibidor requerida para inhibir un componente biológico dado en un 50%. Los extractos de SFE fueron dos a tres veces más eficaces para inhibir las enzimas digestivas que LEA-M.

Uno de los enfoques terapéuticos en el tratamiento de la T2DM es la reducción de la glucemia posprandial a través de la capacidad de los compuestos fenólicos para unirse e inhibir las enzimas digestivas (Dada et al. 2017). La inhibición de la α -amilasa y la α -glucosidasa es probablemente competitiva, el grupo glucósido de la antocianina se une al sitio activo debido a la similitud estructural del sustrato normal. Otro mecanismo es que los grupos hidroxilo de la antocianina y otros compuestos fenólicos podrían interactuar con los grupos polares presentes en el sitio activo de la enzima, cambiando su configuración molecular y, por lo tanto, la actividad enzimática (Sancho y Pastore 2012). Además, los compuestos fenólicos podrían inhibir la actividad de DPP-IV al unirse a los sitios activos de la enzima a través de la interacción de los grupos hidroxilo y puentes de hidrógeno. Como resultado, la inhibición de DPP-IV evita la degradación de las incretinas GLP-1 y GIP, mejorando así la tolerancia a la glucosa en pacientes con T2DM al mejorar sus efectos productores de insulina (L. Fan et al. 2019; Kwak et al. 2018).

Se ha reportado que la inhibición de las enzimas digestivas podría estar más influenciada por los compuestos fenólicos individuales que por los compuestos fenólicos totales (Tan, Chang, y Zhang 2017). Respecto a lo anterior, compuestos fenólicos como la miricetina, la quercetina, la luteolina y la rutina se consideran inhibidores enzimáticos altamente potentes de la α -amilasa, la α -glucosidasa y la DPP-IV (Tan, Chang, y Zhang 2017; L. Fan et al. 2019). En comparación con otros compuestos fenólicos, los compuestos mencionados anteriormente podrían tener varios grupos polares con alta afinidad a los sitios activos de las enzimas digestivas, pudiendo formar enlaces de hidrógeno con aminoácidos y modificar su actividad (Zhang et al. 2019). Por lo tanto, la variación en la capacidad de inhibición de los extractos puede deberse a la alta presión y temperatura utilizadas en SFE y PLE, conduciendo a diferentes perfiles químicos mediante la recuperación de compuestos

fenólicos que no podrían ser extraídos por lixiviación. En este trabajo, se identificaron diferentes compuestos antidiabetes en el extracto de SFE y PLE, como miricetina, quercetina, hidrato de rutina y ácido clorogénico (Ahangarpour, Sayahi, y Sayahi 2019; Tan, Chang, y Zhang 2017; Zhang et al. 2019). El alto potencial antidiabetes que se observó en el extracto de SFE y PLE podría deberse a la sinergia de estas moléculas, el cual proporcionaría un efecto biológico único. Además, hay otros compuestos fenólicos no identificados en una proporción más alta que LEA-M que también pueden haber contribuido al efecto biológico observado (Tabla 7) (J. Fan et al. 2013).

8.7.2 Potencial antioxidante

Los ensayos DPPH y ABTS se basan en la captura directa de los radicales por el antioxidante (Rocha et al. 2017). Como se puede observar en la Figura 22, D y E, los extractos exhibieron una mayor capacidad antioxidante cuando se probaron mediante el ensayo ABTS ya que el impedimento estérico del radical DPPH afecta fuertemente la velocidad de reacción de los compuestos antioxidantes (Babova et al. 2016). Los valores más bajos de IC_{50} se encontraron en el extracto obtenido por SFE y PLE. SFE registró IC_{50} de 0.078 ± 0.01 mg C3GE/g cascarilla contra DPPH y 0.161 ± 0.03 mg C3GE/g cascarilla contra ABTS. Para PLE, se encontraron valores de IC_{50} de 0.158 ± 0.003 mg C3GE/g cascarilla con el método DPPH y 0.349 ± 0.01 mg C3GE/g cascarilla con el método ABTS. Se ha señalado que el potencial antioxidante se debe principalmente a sus compuestos fenólicos (Pereira et al. 2019). La actividad biológica de los compuestos fenólicos está correlacionada con su estructura, incluido el tipo, número y posición de los sustituyentes. La presencia de un grupo catecol, las sustituciones de 3-OH o la inserción de grupos alquilo en el ácido carboxílico de las moléculas de flavonoides puede conducir a un mayor potencial antioxidante (Vukoja, Pichler, y Kopjar 2019; Wang et al. 2013). Esas moléculas tienen una alta capacidad de donación de hidrógeno debido al mayor número de electrones deslocalizados (Maciel et al. 2018). Por lo tanto, además de las antocianinas, SFE y PLE podrían haber extraído fenólicos ligados-insolubles y otros compuestos fenólicos con las características estructurales mencionadas anteriormente, las cuales podrían ser

responsables del aumento del potencial antioxidante (Garcia-Mendoza et al. 2017). La sinergia de estas moléculas también podría proporcionar un fuerte efecto antioxidante.

9. CONCLUSIÓN

SFE y PLE son métodos de extracción alternativos que han demostrado una recuperación eficiente de antocianinas y otros compuestos fenólicos del frijol negro. La temperatura y la composición del co-solvente fueron los factores más importantes para la extracción. La técnica de SFE disminuyó el consumo del solvente y el tiempo de procesamiento de la muestra, además, el extracto rico en antocianinas recuperado mostró un perfil químico diferente en comparación con la extracción convencional por lixiviación. De los once compuestos fenólicos no coloreados identificados en el extracto de SFE, el ácido siríngico, el ácido clorogénico, la catequina, el hidrato de rutina y la miricetina fueron los compuestos principales. Las antocianinas y otros compuestos fenólicos de SFE mostraron un potencial biológico sobresaliente al inhibir las enzimas digestivas y los radicales libres, pudiendo contribuir al manejo de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, su estabilidad sigue siendo uno de los principales desafíos a superar. A pesar de que el extracto de SFE exhibió la misma estabilidad de almacenamiento que el control, se podría mejorar de la estabilidad mediante el uso de co-pigmentos. Los resultados de este trabajo demostraron la viabilidad de la técnica SFE para obtener altos rendimientos de antocianinas y otros compuestos fenólicos con potencial antioxidante y antidiabetes del frijol negro. Además, dado que estas moléculas también tienen colores atractivos, podrían ser de gran interés para la industria alimentaria debido a su posible uso como colorante natural.

10. PERSPECTIVAS

1. Debido a que las extracciones SFE y PLE fueron realizadas en un tiempo fijo, sería recomendable optimizar el tiempo de extracción, ya que posiblemente presenten mejores rendimientos.
2. Es importante analizar el contenido de carbohidratos y proteínas del frijol que queda después de las extracciones SFE y PLE, para una posible aplicación como ingrediente alimentario.
3. Sería interesante estudiar a profundidad los compuestos fenólicos recuperados por fluidos supercríticos y líquidos presurizados, realizar un análisis cuantitativo para conocer más sobre sus posibles interacciones.
4. El potencial biológico determinado en el presente estudio fue por medio de pruebas bioquímicas, por lo que sería conveniente estudiar estos efectos en células o *in vivo*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, Yolanda, Luis Mojica, Miguel Rebollo-Hernanz, Mark Berhow, Elvira González De Mejía, y María A. Martín-Cabrejas. 2016. "Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage". *Food Chemistry* 212 (diciembre): 561–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.022>.
- Aguirre, E.A., y C.A. Gómez-Aldapa. 2010. "Evaluación de las características fisicoquímicas en la especie de frijol *Phaseolus vulgaris* de las variedades; Pinto Saltillo, Bayo Victoria y Negro San Luis". *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1101–8.
- Ahangarpour, Akram, Majed Sayahi, y Miaad Sayahi. 2019. "The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study". *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.051>.
- Audesirk, Teresa. 2013. "La vida en la tierra". En *Biología. La vida en la Tierra*, 9:1004. Pearson Educación de México, S.A de C.V., México, 2014.
- Babova, Oxana, Andrea Occhipinti, Andrea Capuzzo, y Massimo E. Maffei. 2016. "Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent". *The Journal of Supercritical Fluids* 107 (enero): 358–63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.029>.
- Benito-Román, Óscar, Víctor H. Alvarez, Esther Alonso, Maria J. Cocero, y Marleny D.A. Saldaña. 2015. "Pressurized aqueous ethanol extraction of β -glucans and phenolic compounds from waxy barley". *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.006>.
- Blair, Meg. 2016. "Diabetes Mellitus Review." *Urologic nursing*. <https://doi.org/10.7257/1053-816X.2016.36.1.27>.
- Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG, Quintanar Escorza MA. 2013. "Estrés oxidativo y Diabetes Mellitus". *Rev. Educ. Bioquímica* 32 (2): 51–64.
- Campbell, N.A., & Reece, J.B. 2008. "Campbell Biology (8th Edition)". En *Biology*, 764–85.

- Casas, L., C. Mantell, M. Rodríguez, A. Torres, F.A. Macías, y E. Martínez de la Ossa. 2007. "Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L." *The Journal of Supercritical Fluids* 41 (1): 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.09.001>.
- Castañeda-Ovando, Araceli, Ma de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma Elena Páez-Hernández, José A. Rodríguez, y Carlos Andrés Galán-Vidal. 2009. "Chemical studies of anthocyanins: A review". *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- Chávez-Mendoza, Celia, y Esteban Sánchez. 2017. "Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health". *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22081360>.
- Cheynier, Véronique, Gilles Comte, Kevin M. Davies, Vincenzo Lattanzio, y Stefan Martens. 2013. "Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology". *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.
- Dada, Felix A., Sunday I. Oyeleye, Opeyemi B. Ogunsuyi, Tosin A. Olasehinde, Stephen A. Adefegha, Ganiyu Oboh, y Aline A. Boligon. 2017. "Phenolic constituents and modulatory effects of *Raffia* palm leaf (*Raphia hookeri*) extract on carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type-2 diabetes". *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.01.003>.
- Espada-Bellido, Estrella, Marta Ferreiro-González, Gerardo F. Barbero, Ceferino Carrera, Miguel Palma, y Carmelo G. Barroso. 2018. "Alternative Extraction Method of Bioactive Compounds from Mulberry (*Morus nigra* L.) Pulp Using Pressurized-Liquid Extraction". *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1218-x>.
- Fan, Junfeng, Michelle H. Johnson, Mary Ann Lila, Gad Yousef, y Elvira Gonzalez De Mejia. 2013. "Berry and citrus phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase IV: Implications in diabetes management". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2013/479505>.
- Fan, Linlin, Ying Wang, Pujun Xie, Lixia Zhang, Yahui Li, y Jianzhong Zhou. 2019.

- “Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation”. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103>.
- Frank, Seibert A. 2010. “EXTRACTION AND LEACHING”. En *Chemical Process Equipment*, 481–520. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372506-6.00004-6>.
- Ganesan, Kumar, y Baojun Xu. 2017. “Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits”. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11): 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>.
- Garcia-Mendoza, Maria del Pilar, Faber Ariel Espinosa-Pardo, Andressa Mara Baseggio, Gerardo Fernández Barbero, Mário Roberto Maróstica Junior, Mauricio Ariel Rostagno, y Julian Martínez. 2017. “Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids”. *The Journal of Supercritical Fluids* 119 (enero): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>.
- Garzón, Gloria Astrid. 2008. “Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión”. *Acta Biol. Colomb.*
- Girolamo, Guillermo Di, Alejandra Lorena Tamez Peña, y Héctor Eloy Tamez Pérez. 2008. “Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4: Farmacodinamia, farmacocinética y seguridad”. *Medicina Interna de Mexico*.
- Golam Masu, A.S.M., Laila Khandaker, Janelle Berthold, Lori Gates, Katelyn Peters, Hardy Delong, y Khwaja Hossain. 2011. “Anthocyanin, Total Polyphenols and Antioxidant Activity of Common Bean”. *American Journal of Food Technology* 6 (5): 385–94. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.385.394>.
- Gowd, Vemana, Zhenquan Jia, y Wei Chen. 2017. “Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes – A review of recent advances”. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.015>.
- Guajardo-Flores, D., M. García-Patiño, D. Serna-Guerrero, J. A. Gutiérrez-Uribe, y S. O. Serna-Saldívar. 2012. “Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans”. *Food*

- Chemistry* 134 (3): 1312–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.020>.
- Guo, Honghui, y Min Xia. 2013. “Anthocyanins and Diabetes Regulation”. En *Polyphenols in Human Health and Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00008-6>.
- Guzmán-Figueroa, Ma del Pilar; Ortega-Regules, Ana; Anaya-Berrios, Cecilia. 2010. “Piranoantocianinas modificaciones estructurales de antocianinas”. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos* 1–4: 84–95. [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Guzman-Figueroa-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Guzman-Figueroa-et-al-2010.pdf).
- Juliasih, Ni Luh Gede Ratna, Lee Chang Yuan, Yoichi Atsuta, y Hiroyuki Daimon. 2016. “Development of coupled supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography for quinone analysis in activated sludge”. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1086803>.
- Khoo, Hock Eng, Azrina Azlan, Sou Teng Tang, y See Meng Lim. 2017. “Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits”. *Food & Nutrition Research* 61 (1): 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.
- Klisurova, Daniela, Ivalina Petrova, Manol Ognyanov, Yordan Georgiev, Maria Kratchanova, y Petko Denev. 2019. “Co-pigmentation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) anthocyanins with phenolic co-pigments and herbal extracts”. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.125>.
- Kopcak, Uiram, y Rahoma Sadeg Mohamed. 2005. “Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures”. *Journal of Supercritical Fluids* 34 (2 SPEC. ISS.): 209–14. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.11.016>.
- Kühn, Sabine, y Feral Temelli. 2017. “Recovery of bioactive compounds from cranberry pomace using ternary mixtures of CO₂+ ethanol + water”. *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.07.028>.
- Kwak, Myeong Ja, Sun Mi Je, Hyo Cheng Cheng, Se Myeong Seo, Jeong Ho Park, Saeng Geul Baek, Inkyin Khaine, et al. 2018. “Night light-adaptation strategies for photosynthetic apparatus in yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) exposed to artificial night lighting”. *Forests* 9 (2): 1–25. <https://doi.org/10.3390/f9020074>.

- Luna-vital, Diego A, Luis Mojica, y Elvira Gonz. 2014. "Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review". *FRIN* 76: 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>.
- Machado, Ana Paula Da Fonseca, José Luis Pasquel-Reátegui, Gerardo Fernández Barbero, y Julian Martínez. 2015. "Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods". *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>.
- Maciel, Laércio Galvão, Mariana Araújo Vieira do Carmo, Luciana Azevedo, Heitor Daguer, Luciano Molognoni, Mereci Mendes de Almeida, Daniel Granato, y Neiva Deliberali Rosso. 2018. "Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities". *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.053>.
- Maran, J. Prakash, B. Priya, y S. Manikandan. 2014. "Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp". *Journal of Food Science and Technology* 51 (9): 1938–46. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1237-y>.
- May, Mike. 2009. "Novo awaits green light for diabetes drug". *Nature Biotechnology* 27 (8): 682–84. <https://doi.org/10.1038/nbt0809-682c>.
- Messina, Virginia. 2014. "Nutritional and health benefits of dried beans". En *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 100. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071472>.
- Mojica, Luis, Mark Berhow, y Elvira Gonzalez de Mejia. 2017. "Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential". *Food Chemistry* 229: 628–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.124>.
- Mojica, Luis, Allison Meyer, Mark A. Berhow, y Elvira González de Mejía. 2015. "Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration". *Food Research International* 69: 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.007>.
- Nauck, Michael A., y Juris J. Meier. 2018. "Incretin hormones: Their role in health and

- disease". *Diabetes, Obesity and Metabolism*. <https://doi.org/10.1111/dom.13129>.
- Oyama, Kin-ichi, Tomomi Yamada, Daisuke Ito, Tadao Kondo, y Kumi Yoshida. 2015. "Metal Complex Pigment Involved in the Blue Sepal Color Development of Hydrangea". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (35): 7630–35. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02368>.
- Paes, Juliana, Raquel Dotta, Gerardo F. Barbero, y Julian Martínez. 2014. "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids". *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>.
- Pereira, Débora Tamires Vitor, Adriana Gadioli Tarone, Cinthia Baú Betim Cazarin, Gerardo Fernández Barbero, y Julian Martínez. 2019. "Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc". *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.07.019>.
- Pratley, Richard E., y Afshin Salsali. 2007. "Inhibition of DPP-4: a new therapeutic approach for the treatment of type 2 diabetes". *Current Medical Research and Opinion* 23 (4): 919–31. <https://doi.org/10.1185/030079906X162746>.
- Quiceno, J., Ospina, L., David, D., Román, M., Betancur, M., Cadavid, N., y C. Cardona, L., Muñoz L., Imbachí, P., Martínez, B., Passaro. 2017. *Manual para el análisis de biocompuestos en frutas. Aplicaciones en el Estudio de GULUPA*. Servicio Nacional de Aprendizaje.
- Ranilla, Lena Gálvez, Maria Inés Genovese, y Franco Maria Lajolo. 2007. "Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1): 90–98. <https://doi.org/10.1021/jf062785j>.
- Rein, Maarit J. 2005. "Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins". *Dissertation Uni Helsinki*. <https://doi.org/10.1021/jf071205v>.
- Rocha, Renan Paulo, Mariana Machado, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, Christina C. Vinson, Maurício Leite, Rafael Richard, Leonardo Brantes Bacellar Mendes, et al. 2017. "Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs". *Algal Research* 28 (March): 139–50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.021>.

- SAGARPA. 2017. "Frijol Mexicano". *Planeación Agrícola Nacional 2017 - 2030*.
- Sahena, F., I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, y A.K.M. Omar. 2009. "Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review". *Journal of Food Engineering* 95 (2): 240–53. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>.
- Sancho, Renata A.Soriano, y Glauca Maria Pastore. 2012. "Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes". *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.021>.
- Shahidi, Fereidoon, y JuDong Yeo. 2016. "Insoluble-Bound Phenolics in Food". *Molecules* 21 (9): 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>.
- Tan, Yuqing, Sam K.C. Chang, y Yan Zhang. 2017. "Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera". *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.100>.
- Tangvarasittichai, Surapon. 2015. "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus". *World Journal of Diabetes* 6 (3): 456. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>.
- Trouillas, Patrick, Juan C. Sancho-García, Victor De Freitas, Johannes Gierschner, Michal Otyepka, y Olivier Dangles. 2016. "Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment". *Chemical Reviews* 116 (9): 4937–82. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>.
- Tundis, R., M R Loizzo, y F. Menichini. 2010. "Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update." *Mini reviews in medicinal chemistry* 10 (4): 315–31. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>.
- Ulloa, José Armando, M C Petra, Rosas Ulloa, José Carmen, Ramírez Ramírez, I B Q Blanca, y Estela Ulloa. 2011. "El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos". *Revista Fuente* 3 (8): 5–9. <https://doi.org/ISSN 2007 - 0713>.
- Vukoja, Pichler, y Kopjar. 2019. "Stability of Anthocyanins, Phenolics and Color of Tart Cherry Jams". *Foods* 8 (7): 255. <https://doi.org/10.3390/foods8070255>.

- Wang, Yihai, Limin Xiang, Chunhua Wang, Chao Tang, y Xiangjiu He. 2013. "Antidiabetic and Antioxidant Effects and Phytochemicals of Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) Polyphenol Enhanced Extract". *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071144>.
- Weidner, Stanisław, Angelika Król, Magdalena Karamać, y Ryszard Amarowicz. 2018. "Phenolic compounds and the antioxidant properties in seeds of green- and yellow-podded bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties". *CyTA - Journal of Food* 16 (1): 373–80. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1407826>.
- Yang, Qiong Qiong, Ren You Gan, Ying Ying Ge, Dan Zhang, y Harold Corke. 2018. "Polyphenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, Analysis, and Factors Affecting Composition". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12391>.
- Yang, Hui, Xun Jin, Christopher Wai Kei Lam, y Sheng-Kai Yan. 2011. "Oxidative stress and diabetes mellitus". *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49 (11). <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.250>.
- Yeo, JuDong, y Fereidoon Shahidi. 2019. "Analysis of Flavonoid-Protein Interactions by Advanced Techniques". En *Encyclopedia of Food Chemistry*, 539–43. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21507-2>.
- Zhang, Qiaozhi, Elvira Gonzalez de Mejia, Diego Luna-Vital, Tianyi Tao, Subhiksha Chandrasekaran, Laura Chatham, John Juvik, Vijay Singh, y Deepak Kumar. 2019. "Relationship of phenolic composition of selected purple maize (*Zea mays* L.) genotypes with their anti-inflammatory, anti-adipogenic and anti-diabetic potential". *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.116>.
- Zhao, Zhengang, Huaifeng Yan, Rui Zheng, Muhammad Saeed Khan, Xiong Fu, Zi Tao, y Zhanying Zhang. 2018. "Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts". *Industrial Crops and Products* 113: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.015>.