

Capítulo 15

Potencial nutracéutico y cosmecéutico del frijol criollo en la región Pacífico Sur de México¹

Montserrat Alcázar Valle², David Fonseca Hernández², Jonhatan Contreras², Luis Mojica Contreras², Eugenia Lugo Cervantes^{2*}

Resumen

Los alimentos derivados de plantas proporcionan, además de nutrientes, compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, que proporcionan beneficios adicionales a la salud humana. Estos compuestos están presentes en alimentos como cereales, frutas y leguminosas. Existen cerca de 20 especies de leguminosas que se utilizan como granos secos en cantidades considerables para la nutrición humana; una de las especies más consumidas es el frijol. En México se cultivan principalmente cinco especies de frijol: el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol comba (*Phaseolus lunatus*), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), frijol íbes o gordo (*Phaseolus polyanthus*) y frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*). Una de las regiones con mayor producción y diversidad de especies es la región del Pacífico Sur, que comprende los estados de Chiapas, Guerrero y Oaxaca. En el presente capítulo se presentan los resultados del muestreo de las accesiones de frijol criollo en la región del Pacífico Sur, con el objetivo de conocer su contenido nutricional, los posibles componentes antinutricionales y su potencial como

¹ <https://doi.org/10.5281/zenodo.13227929>

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad de Tecnología Alimentaria, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, México 45019.

* elugo@ciatej.mx

fuelle de compuestos bioactivos. Se observó que las accesiones colectadas de colores oscuros (negros y rojos) fueron los que presentaron el mayor contenido de proteína, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, independientemente del estado donde fue colectado. Además, se observó que los extractos de algunas accesiones de frijol que contienen compuestos fenólicos presentan potencial antiinflamatorio y antienvejecimiento. Por lo anterior, se podrían utilizar estas accesiones de frijol como ingredientes con potencial nutraceutico y/o cosmeceútico.

Palabras clave: Actividad antiinflamatoria, actividad antienvejecimiento, compuestos bioactivos.

Introducción

Las leguminosas son fuentes de carbohidratos (55-60%), proteína (17-40%) y fibra (29-47%). Además, contienen otros compuestos minoritarios como vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye una alta actividad nutraceutica, es decir, que son compuestos que pueden ayudar a mejorar la salud (Carbas *et al.*, 2020). Estos compuestos han sido reportados como conservadores naturales de los alimentos y juegan un papel muy importante en la prevención de algunas enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares e inclusive algunos tipos de cáncer (Alcázar-Valle *et al.*, 2021). Sin embargo, también contienen compuestos, que por sus características funcionales son considerados como antinutricionales, comprometen la disponibilidad y, consecuentemente, la calidad nutricional de las leguminosas, aunque en bajas cantidades estos compuestos también pueden ser benéficos para la salud (Carbas *et al.*, 2020).

El frijol (*Phaseolus spp.*) es una de las leguminosas más importantes debido a su valor nutricional y al aporte de moléculas que proporcionan beneficios a la salud de los consumidores. Es considerado como la segunda fuente de proteína en algunos países de África y la cuarta en América (Alcázar-Valle *et al.*, 2020). Además, es una de las especies de frijol más

consumidas y por ende más estudiada, contiene altas cantidades de almidón, fibra, minerales y vitaminas, y una gran variedad de metabolitos secundarios como flavonoides, antocianinas, taninos, flavonoles, ácidos fenólicos e isoflavones, a los cuales se les atribuye una alta actividad antioxidante. Esta actividad antioxidante se basa en la neutralización de los radicales libres, evitando la generación de procesos oxidativos en la célula. Algunos factores que inducen la producción de radicales libres provienen del medio ambiente, como la radiación ultravioleta, gases contaminantes y sustancias tóxicas. Por lo tanto, el consumo del frijol tiene una gran asociación con muchos beneficios fisiológicos a la salud como la prevención de enfermedades no transmisibles y en la reducción del proceso de envejecimiento prematuro (Yang *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2021).

Además del frijol común, en México existen otras cuatro especies domésticas que se cultivan principalmente: frijol comba (*P. lunatus*), ayocote (*P. coccineus*), frijol gordo o ibes (*P. dumosus* o *P. polyanthus*) y frijol tépari (*P. acutifolius*). Las especies de *P. lunatus* y *P. coccineus* ocupan el segundo y tercer lugar de consumo, respectivamente, a nivel mundial. Por lo anterior, estas especies requieren de atención y estudio para poder diseñar acciones de conservación y aprovechamiento (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017; Alcázar-Valle *et al.*, 2021).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), en su último boletín mensual publicado en febrero del 2020, en el ciclo de producción de frijol primavera-verano 2018-2019, los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero se encontraron dentro de los 10 estados con mayor producción de frijol. Estos estados, que conforman la región Pacífico Sur de México, presentan grandes desigualdades y asimetrías sociales y económicas. Por lo anterior, en el presente capítulo nos enfocaremos en presentar los resultados relacionados a la extracción, identificación y caracterización de los componentes fisicoquímicos, el contenido nutricional y actividad biológica de las variedades de frijol criollo de los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas para determinar su potencial nutracéutico y cosmecéutico.

Materiales y métodos

Se realizaron diversas colectas en los municipios productores de cada uno de los estados que comprenden la región Pacífico Sur. Este muestreo se realizó en los meses de marzo a septiembre del 2019, con el objetivo de coleccionar la mayor diversidad posible de las accesiones de frijol criollo que se cultivan en cada región (**Tabla 1**).

Tabla 1. Colecta de frijol criollo en los estados de Chiapas, Guerrero y Oaxaca

Estado	Mes (2019)	Municipios
Chiapas	Marzo	Tenejapa, Villaflores, Teopisca, Chenalhó, Patenlho, Chamula.
Oaxaca	Julio	Nochixtlán, Sayulitepec, Huixtepec, Nopala, Ayoquezco, Santa Lucía.
	Septiembre	Cuicatlan, Lachatao, Ixtlán, Díaz Ordaz.
Guerrero	Agosto	Mexcaltepec, Tecoaapa, Pilcaya, Iguala, Xochistlahuaca, Tepecoacuilco.

Posteriormente, en el laboratorio se procedió a lavar y secar las accesiones de frijol para eliminar cualquier material extraño y proceder con los análisis fisicoquímicos, la extracción, cuantificación y caracterización de los compuestos fenólicos, y la determinación de la actividad antioxidante. También se analizaron los componentes antinutricionales y, finalmente, se analizó la actividad biológica de algunas variedades de frijol.

Análisis fisicoquímico, contenido nutricional y antinutricional de las accesiones de frijol criollo colectadas

Se determinó el tamaño del frijol al medir y pesar aleatoriamente 100 semillas de frijol. Además, se realizó la evaluación del color de acuerdo a la escala CIE $L^*A^*B^*$, mediante un espectrofotómetro (CM-5, Konica Minolta, China). Además, se efectuó el análisis proximal de las 56 accesiones de frijol (humedad, cenizas, grasas, proteína, carbohidratos y fibra cruda) y se determinó el contenido de aminoácidos libres esenciales y no esenciales.

Se realizó el análisis del ácido fítico, oligosacáridos, actividad de lectina y actividad inhibitoria de tripsina en las 56 accesiones de frijol colectadas (Alcázar-Valle *et al.*, 2020, 2021).

Extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos y determinación de actividad antioxidante las accesiones de frijol criollo colectadas

Se realizaron extracciones de las accesiones colectadas por maceración, lixiviación y fluidos supercríticos (Alcázar-Valle *et al.*, 2020; Hsieh-Lo *et al.*, 2020), con el objetivo de obtener extractos ricos en compuestos fenólicos. Se les determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Akilioglu & Karakaya, 2010), el contenido de flavonoides por el ensayo de cloruro de aluminio (Del Toro-Sánchez *et al.*, 2015) y el contenido de taninos condensados por medio del método de vainillina-ácido sulfúrico (Sun *et al.*, 1998). La determinación de antocianinas se realizó a partir del análisis de la cascarilla de frijol, utilizando el método AOAC 2005.2 (Mojica *et al.*, 2015). Posteriormente, se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos por UHPLC, por medio de un detector PDA (Acquity Arc., Waters, EUA), con una columna C18 Cortecs 2.7 μm 4.6x150 mm (Alcázar-Valle *et al.*, 2020). Finalmente, la actividad antioxidante se determinó mediante los ensayos de ABTS y DPPH (Tovar-Pérez *et al.*, 2017).

Análisis de la actividad biológica de las accesiones de frijol criollo colectadas

Se determinó la actividad antiinflamatoria mediante kits de detección del inhibidor iNOS, COX-1 y COX-2 (Contreras *et al.*, 2023). Además, se determinó la actividad antienvjecimiento y antiinflamatoria por la inhibición de las enzimas tirosinasa, elastasa, COX-2 y iNOS (Fonseca *et al.*, 2021, 2023).

Se realizaron estadísticos que incluyen: promedio, desviación estándar, prueba t de student, análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y análisis de grupos heterogéneos por prueba de Tukey.

Además, se realizaron análisis de discriminantes y de componentes principales para observar si existe alguna correlación entre los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de las accesiones colectadas. Se utilizó el software estadístico STATGRAPHIS CENTURION XVI (Versión 16.1.03).

Resultados y discusión

Muestreo del frijol criollo en las zonas productoras de la región Pacífico sur

Se colectaron en total 56 accesiones en los estados Chiapas, Guerrero y Oaxaca (**Tabla 2**), de las cuales dos pertenecen a la especie *P. polyanthus*, cuatro a la especie *P. coccineus*, cuatro a la especie *P. lunatus* y 46 a la especie de *P. vulgaris*.

Tabla 2. Accesiones de frijol (*Phaseolus* spp.) criollo colectadas en la región Pacífico sur (Alcázar-Valle et al., 2020, 2021)

Estado	Especies colectadas	Total, de accesiones
Chiapas	<i>P. coccineus</i> , <i>P. lunatus</i> , <i>P. polyanthus</i> , <i>P. vulgaris</i>	18
Guerrero	<i>P. coccineus</i> , <i>P. lunatus</i> , <i>P. vulgaris</i>	18
Oaxaca	<i>P. coccineus</i> , <i>P. vulgaris</i>	20

El estado de Chiapas presentó la mayor diversidad de especies. De las cinco principales especies domesticadas en México (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017), se colectaron accesiones de cuatro de estas especies.

Análisis fisicoquímicos del frijol criollo colectado en la región Pacífico Sur

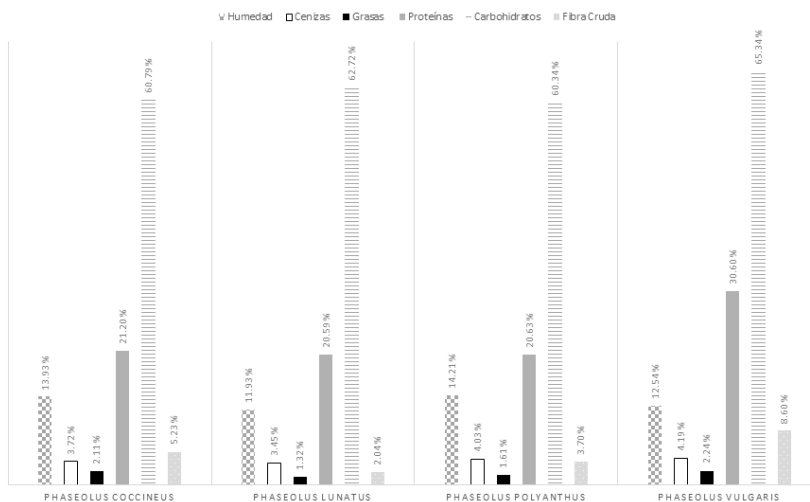
Se obtuvo una amplia diversidad en cuanto a tamaño y color de las semillas de frijol (Alcázar-Valle et al., 2020, 2021). Los resultados concuerdan con algunos reportes donde mencionan que las accesiones de frijol común (*P. vulgaris*) son más pequeñas en las regiones del centro-sur del país, en

especial en los estados de Guerrero y Oaxaca (Espinosa-Pérez *et al.*, 2015). De acuerdo al tamaño de las accesiones colectadas de frijol ayocote (*P. coccineus*), estas son consideradas como grandes en función del peso de 100 semillas. No obstante, en cuanto a su longitud, todas las accesiones se pueden considerar como medianas, ya que existe evidencia de que accesiones de *P. coccineus* pueden presentar longitudes mayores a los 25 mm, siendo que las semillas colectadas presentaron una longitud promedio de 15 mm (Sinkovic *et al.*, 2019). Finalmente, en cuanto a su peso, las accesiones de frijol comba (*P. lunatus*) y frijol gordo (*P. polyanthus*) son consideradas como semillas grandes, lo anterior concuerda a las características de estas especies estudiadas en algunos reportes (Agostini-Costa *et al.*, 2015). En cuanto a las características del color, algunos reportes mencionan que el color violeta de las variedades de frijol ayocote es característico de las semillas que pertenecen al germoplasma Andino (Sinkovic *et al.*, 2019). En el presente estudio de las cuatro accesiones colectadas de frijol ayocote, tres cumplen con esta característica. Algunos reportes mencionan que las accesiones rojas de frijol común son las que predominan en el estado de Guerrero; en Oaxaca, la mezcla de colores en las semillas de frijol común (Espinosa-Pérez *et al.*, 2015). Sin embargo, en el presente estudio se encontraron accesiones de diversos colores en los tres estados de colecta.

Contenido nutricional del frijol criollo colectado en la región Pacífico Sur

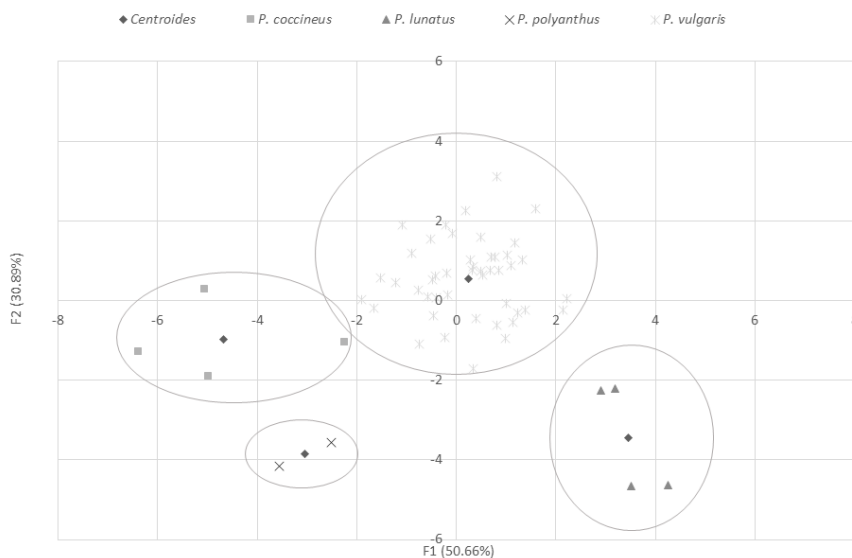
En el contenido nutricional de las semillas colectadas (**Gráfica 1**) se observó que todas las accesiones se encuentran dentro de los rangos reportados en otros estudios de leguminosas, donde los componentes mayoritarios son los carbohidratos y las proteínas (Grela *et al.*, 2017). Las accesiones de frijol común (*P. vulgaris*) presentaron un mayor contenido de proteína (30.60%). Chávez-Mendoza & Sánchez (2017) reportan que el contenido de proteína en variedades de frijol común oscila entre el 14 al 33 %.

Gráfica 1. Análisis proximal de las especies de frijol criollo colectadas en la región Pacífico Sur (Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020,2021)



Finalmente, en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales, se sabe que el frijol es fuente rica de aminoácidos como la lisina, leucina y fenilalanina (Grela *et al.*, 2017), mientras que los aminoácidos no esenciales mayoritarios son el ácido glutámico y la arginina (Grela *et al.*, 2017). Al realizar un análisis discriminante del contenido de aminoácidos libres esenciales y no esenciales, fueron utilizados las 56 accesiones de frijol para desarrollar el modelo entre las cuatro especies colectadas, donde 18 aminoácidos analizados fueron introducidos como variables predictivas. Las tres funciones discriminantes obtenidas son estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95% ($p < 0.05$). Estas diferencias y similitudes en el contenido de aminoácidos hacen que las funciones discriminantes puedan agrupar y distinguir a las especies de frijol en un 100% (**Gráfica 2**) (Alcázar-Valle *et al.*, 2020, 2021)

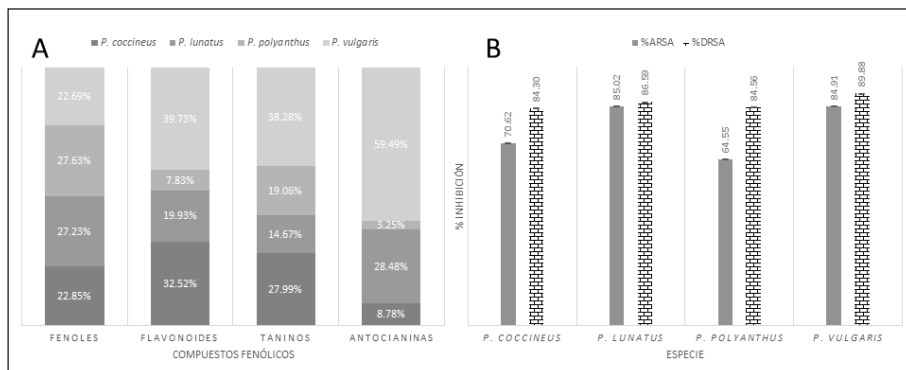
Gráfica 2. Análisis discriminante de las accesiones de frijol criollo en función de los aminoácidos libres esenciales y no-esenciales (Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020,2021)



Componentes antinutricionales del frijol criollo de la región Pacífico Sur

En el caso de componentes antinutricionales, las accesiones de frijol ayocote (*P. coccineus*) presentaron la mayor concentración de oligosacáridos; mientras que las accesiones de frijol comba (*P. lunatus*) un mayor porcentaje de ácido fítico y de actividad inhibitoria de tripsina. El mayor porcentaje de lectina se obtuvo en las accesiones de frijol común (**Gráfica 3**). Algunos estudios han reportado que el ácido fítico, la lectina y los inhibidores de tripsina pueden conferir algunos beneficios a la salud relacionado con enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Carbas *et al.*, 2020). Por lo anterior, se puede concluir que no solo las variedades de frijol común presentan potencial nutracéutico, sino que también las especies de frijol comba y frijol ayocote.

Grafica 3. Relación de los componentes antinutricionales de las especies de frijol criollo de la región Pacífico Sur (Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020,2021)



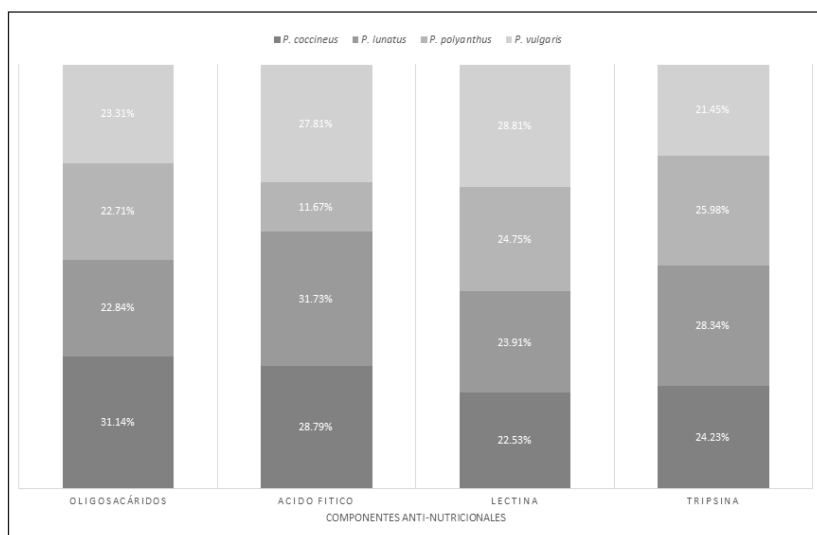
Extracción y caracterización de los compuestos bioactivos de las accesiones de frijol criollo de la región Pacífico Sur

Se realizaron extracciones por maceración con acetona al 70% (Agostini-Costa *et al.*, 2015) a partir de la harina de frijol de las 56 accesiones colectadas. Se determinó la concentración de los fenoles totales, flavonoides y taninos. La extracción etanólica de las antocianinas se realizó a partir de la cascarilla de las semillas de colectadas debido a que es ahí donde se concentran estos compuestos ya que proporcionan el color de la semilla (Mojica *et al.*, 2015). Además, se analizó su actividad antioxidante por las técnicas de ABTS y DPPH (Alcázar-Valle *et al.*, 2020, 2021).

En relación a los compuestos fenólicos totales, las especies colectadas no presentaron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, las accesiones de frijol común (*P. vulgaris*) fueron las que presentaron un mayor porcentaje de concentración de flavonoides, taninos y antocianinas (Gráfica 4A). Las accesiones de frijol ayocote (*P. coccineus*) secundan en porcentaje de flavonoides y taninos, mientras que las accesiones de frijol comba (*P. lunatus*) ocupan el segundo lugar en contenido de antocianinas. En este sentido, Díaz *et al.* (2010) encontraron que el genotipo rojo de diferentes accesiones de frijol común mostró diferencias estadísticas signi-

ficativas en la producción de antocianinas en comparación con accesiones de color morado y café. No obstante, en el presente estudio se observó que es el genotipo negro el que presenta diferencias estadísticas significativas en la concentración de antocianinas ($p<0.05$), independientemente del tipo de especie.

Gráfica 4. Relación de (A) compuestos fenólicos y (B) actividad inhibitoria de los radicales ABTS (%ARSA) y DPPH (%DRSA) de las especies de frijol criollo de la región Pacífico Sur (Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020,2021)



Además, se determinó la actividad antioxidante por las técnicas ABTS y DPPH al calcular el porcentaje de inhibición de ambos radicales (**Gráfica 4B**). Con ambos ensayos se observó que existe actividad antioxidante en todas las accesiones colectadas. Sin embargo, las accesiones de frijol común fueron las que presentaron una mayor actividad antioxidante, seguida de las accesiones de frijol comba.

Debido a que las accesiones de Chiapas presentaron un mayor contenido en compuestos fenólicos, se realizó la caracterización y cuantificación de estos extractos por UHPLC (Alcázar-Valle *et al.*, 2020). Existe evidencia

reportada de cuáles son los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en algunas variedades de frijol tanto comercial como silvestre de frijol común (Yang *et al.*, 2018). Algunos reportes han demostrado que los flavonoides mayoritarios en algunas accesiones de frijol común son la quercetina y el kaempferol; ambos compuestos han demostrado disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y del cáncer pulmonar (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017). En el presente estudio el kaempferol 3-glucósido se detectó sólo en algunas accesiones del frijol común, mientras que la quercetina 3-glucósido se encontró en todas las accesiones colectadas (**Tabla 3**), excepto en las accesiones del frijol gordo o ibes (*P. polyanthus*). Sin embargo, la presencia de genisteína se observó en ambas accesiones del frijol gordo, inclusive en concentraciones más altas a las mostradas por las accesiones de frijol ayocote (*P. coccineus*) y frijol común (*P. vulgaris*). Este isoflavonoide es caracterizado como un compuesto fitoestrógeno que puede inhibir las células carcinógenas, incluyendo las de próstata y mama, y hasta el momento sólo se había reportado su presencia en algunas variedades de frijol común durante su germinación (Díaz-Batalla *et al.*, 2006). Además, se detectó ácido ferúlico en las accesiones de frijol comba (*P. lunatus*) y frijol común. Finalmente, se detectó la presencia de antocianinas en las variedades de frijol común negro. La accesión CH-10 presentó una mayor concentración de antocianinas (Alcázar-Valle *et al.*, 2020; Contreras *et al.*, 2023). Lo anterior confirma que la composición de antocianinas en las semillas de frijol puede variar, inclusive si las variedades tienen el mismo color, por lo que el contenido de antocianinas depende tanto de factores externos (condiciones climáticas y de suelo) y factores internos (variación genética) (Akond *et al.*, 2011). Algunos estudios han demostrado que diferentes especies de leguminosas tienen una amplia variación en su capacidad de absorber, transportar y almacenar flavonoides, polifenoles y antocianinas, estas interacciones causan una gran diversidad de compuestos presentes en las semillas de frijol (Capistrán-Carabarin *et al.*, 2019).

Tabla 3. Compuestos fenólicos (µg/g de harina de frijol) en las especies de frijol criollo de Chiapas

Especie	Ácido ferúlico	Cianidina 3-glucosido	Kaempferol 3-glucosido	Quercetina 3-glucosido	Genisteína
<i>P. coccineus</i>	ND	ND	ND	187.87 ^B ± 20.29	57.93 ^B ± 16.49
<i>P. lunatus</i>	1.10 ^C ± 0.62	ND	ND	265.5 ^C ± 28.65	ND
<i>P. polyanthus</i>	ND	ND	ND	ND	91.01 ^C ± 16.49
<i>P. vulgaris</i>	0.56 ^B ± 0.17	27.01 ^B ± 8.72	224.61 ^B ± 22.41	263.77 ^C ± 7.96	61.28 ^B ± 6.47

ND= no detectado, datos promedio ± desviación estándar, diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey (p<0.05) (Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020)

A partir de los resultados obtenidos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de explicar la variabilidad de las accesiones colectadas a partir de su contenido fenólico, componentes nutricionales y antinutricionales y su actividad antioxidante. Por lo tanto, se generaron cuatro componentes principales que explican el 65.23% de los datos, obteniendo que las 56 accesiones colectadas se pueden clasificar en tres grupos (**Tabla 4**): Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y contenido de proteína. Oligosacáridos y ácido fítico. Fibra cruda y actividad inhibitoria de tripsina

Se observa que las accesiones de frijol común de color rojo y negra, independientemente del estado donde fueron colectadas, presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos, contenido de proteína y actividad antioxidante. Las accesiones de frijol gordo, ayocote y comba presentaron valores de interés en el contenido de fibra, actividad inhibitoria de tripsina, oligosacáridos y ácido fítico.

Tabla 4. Análisis de componentes principales, variedades agrupadas

Grupo	Variedades						
Compuestos fenólicos, proteína y actividad antioxidante	 Ox-1	 Ox-2	 Ox-3	 Ox-4	 Ox-5	 Ox-9	 Ox-10
	 Ox-13	 Ox-15	 Ox-16	 GR-04	 GR-10	 GR-13	 GR-14
	 CH-01	 CH-02	 CH-03	 CH-04	 CH-05	 CH-09	 CH-10
	 CH-13						
Oligosacáridos, ácido fítico	 Ox-6	 Ox-7	 Ox-14	 Ox-17	 Ox-18	 Ox-19	 Ox-20
	 GR-06	 GR-15	 GR-16	 GR-17	 GR-18	 CH-08	 CH-14
	 CH-18						
Fibra cruda, actividad inhibitoria de tripsina	 Ox-8	 Ox-11	 Ox-12	 GR-01	 GR-03	 GR-05	 GR-07
	 GR-08	 GR-09	 GR-11	 GR-12	 CH-06	 CH-07	 CH-11
	 CH-12	 CH-15	 CH-16	 CH-17			

(Adaptado de Alcázar-Valle et al., 2020,2021)

Determinación del potencial antioxidante y antiinflamatorio

La accesión CH-10 destacó como la de mayor contenido de antocianinas totales, por lo cual fue elegida para realizar los siguientes experimentos y determinación debido a la importancia que representan las antocianinas en la prevención y el cuidado de la salud (Alcázar-Valle *et al.*, 2020).

A partir de frijol entero se obtuvo un extracto (EC) utilizando una mezcla de etanol/agua en un equipo de fluidos supercríticos. Posteriormente, dicho extracto se purificó haciéndolo pasar por la resina Amberlite® XAD-7HP en una columna de cromatografía (EP). El potencial biológico de ambos extractos (EC y EP) fue evaluado a través de metodologías para determinar el potencial antioxidante y el potencial antiinflamatorio.

El potencial antioxidante de los extractos (EC y EP) se cuantificó a través de la capacidad de los fitoquímicos presentes en los extractos para interactuar e inhibir directamente a radicales libres producidos en exceso en el entorno de reacción tales como ABTS y el DPPH (Hsieh-Lo *et al.*, 2020). Los resultados de ABTS muestran una inhibición para EC y EP entre 21.6 y 28.3 mg EC3G/L. Mientras que el DPPH muestra una inhibición entre 9.2 y 10.6 mg EC3G/L para el IC₅₀ de EC y EP respectivamente. Además, se realizó el ensayo de óxido nítrico (NO) (Möler *et al.*, 2019). Este ensayo mide el potencial antioxidante de los extractos debido a que los fitoquímicos presentes compiten por el oxígeno y disminuyen la producción de iones nitrito y NO (Goshi *et al.*, 2019). Los resultados mostraron valores de 0.7 y 1.8 mg EC3G/L para el EC y el EP, respectivamente (**Gráfica 5A**).

Los tres ensayos de capacidad antioxidante demuestran que no hay diferencias entre los tratamientos, lo cual puede deberse a la conservación de la mayoría de los compuestos desde el extracto crudo al purificado, comprobando que este proceso no afecta las propiedades antioxidantes de estos. Así mismo, puede concluirse que los extractos de frijol negro pueden inhibir diferentes radicales libres (Gençdağ *et al.*, 2022). Estos resultados podrían estar asociados con la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas.

La inflamación es el proceso biológico en el cuál las células responden al estrés fisicoquímico, metabólico o mecánico producido en su entorno. Esta condición es comúnmente observada y desarrollada previo a otras pa-

tologías como la obesidad, la hipertensión y la diabetes tipo 2 (Boccellino & D'Angelo, 2020). Algunos estudios han informado sobre el potencial antiinflamatorio de extractos de frijol negro (Contreras *et al.*, 2020). Sin embargo, existen pocos trabajos que evalúan cómo se mantiene o modifica dicho potencial como efecto del proceso de purificación (Contreras *et al.*, 2023).

El potencial antiinflamatorio de los extractos (EC y EP) (**Gráfica 5B**) se evaluó mediante la inhibición de enzimas relacionadas con el proceso inflamatorio tales como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Los resultados para la iNOS (**Gráfica 5B**) mostraron valores de IC_{50} de 0.9 mg EC3G/L para EC y de 1.1 mg EC3G/L para EP con diferencias estadísticamente significativas. Con relación a COX-1, los valores de IC_{50} fueron de 0.1 y 0.7 mg EC3G/L para EC y EP respectivamente, resultados que fueron diferentes de acuerdo con la prueba Tukey Post Hoc.

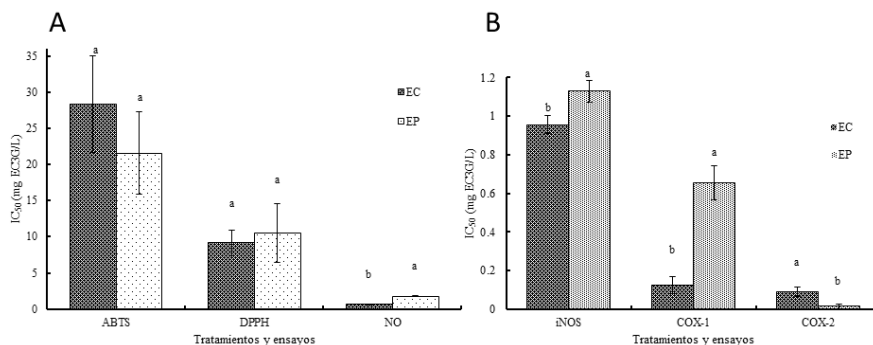
La COX-2 mostró valores de inhibición (**Gráfica 5B**) IC_{50} de 0.09 mg EC3G/L para EC y de 0.01 mg EC3G/L para EP, los cuales fueron diferentes significativamente. Las diferencias encontradas entre los valores de inhibición para cada tipo de extracto pueden estar relacionadas con la concentración de los compuestos bioactivos, así como con la naturaleza y tipo de estos debido a que, dependiendo de esto, las moléculas tendrán o no la capacidad de asociarse e interactuar covalentemente con los sitios activos de las enzimas y desencadenar el mecanismo de inhibición (Hwang *et al.*, 2011).

Dia *et al.* (2008) encontraron que compuestos fenólicos extraídos de soya inhibieron la iNOS con una concentración de 1 mg/ml (66%). Se encontraron reportes de que extractos de lúpulo entre 1 y 10 μ g/mL inhibieron la actividad de iNOS del 23% al 67%, respectivamente (Chung *et al.*, 2009). Un extracto de grosella negra fresca (*Ribes nigrum* L.) resultó eficaz para inhibir la COX-2 (IC_{50} = 1.77 mg/L) y la iNOS (IC_{50} = 0.61 mg/L) (Kowalski & Gonzalez de Mejia, 2021). En otro trabajo, 1 mg/mL de extracto de pericarpio de maíz morado inhibió la COX-2 (89,62%) y concentraciones superiores a 5 mg/mL inhibieron eficazmente la COX-1

(Chen *et al.*, 2017). Estos resultados muestran que los fitoquímicos presentes en extractos naturales de distintas fuentes tienen la capacidad de inhibir las enzimas relacionadas con la inflamación. Por lo tanto, los compuestos bioactivos presentes en los extractos del frijol negro pueden inhibir las enzimas relacionadas con el proceso inflamatorio y actuar, por lo tanto, como moduladores moleculares relacionados con dicho proceso (Ganesan *et al.*, 2017). Con relación a los resultados de inhibición, el EC tiene los valores más altos en dos de las pruebas en comparación con EP, mientras que este último fue más efectivo que EC para la inhibición de COX-2. Esta diferencia podría estar relacionada con un efecto sinérgico entre todos los componentes del extracto crudo como: azúcares, oligosacáridos, derivados glicosilados de fenólicos, saponinas, entre otros (Tan *et al.*, 2022). Sin embargo, aun cuando ambos tratamientos tenían perfiles fitoquímicos diferentes, los compuestos presentes tienen la capacidad de interactuar con las enzimas. Además, hay que destacar que el potencial biológico no se afecta en gran medida con el proceso de purificación, esto dependerá del tipo y las diferentes enzimas con las que estos compuestos interactúen.

La información generada comprueba que las cascarillas del frijol pudieran ser utilizadas como ingredientes para la formulación de alimentos o consumidas directamente debido a sus efectos sobre el estrés oxidativo y la inflamación, lo cual puede prevenir numerosos problemas de salud y enfermedades y, en general, como auxilio en el cuidado y mantenimiento de la salud (Kumar & Goel, 2019).

Gráfica 5. Análisis de los extracto crudo y purificado de la accesión CH-10 (A) actividad antioxidante y (B) actividad antiinflamatoria (Adaptado de Contreras *et al.*, 2023)



***Determinación de la actividad antienvjecimiento y antiinflamatoria.
Inhibición de las enzimas tirosinasa, elastasa, COX-2 e iNOS***

Se seleccionó la accesión CH-15 de frijol negro del estado de Chiapas para la obtención de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos. Se seleccionó esta variedad debido a su alto contenido en compuestos fenólicos totales y antocianinas (Alcázar-Valle *et al.*, 2020). Los compuestos fenólicos obtenidos de fuentes naturales son de gran interés por parte de la industria cosmética debido a su potencial para reducir el proceso de envejecimiento prematuro (Fonseca *et al.*, 2020). La inhibición de la actividad catalítica de las enzimas tirosinasa y elastasa en la piel permite la reducción de signos de envejecimiento como arrugas y manchas. La enzima tirosinasa regula las primeras reacciones de la vía metabólica de melanogénesis, encargada de la síntesis de melanina. La inhibición de esta enzima evita la síntesis excesiva de melanina cuando la piel es expuesta a factores externos dañinos como la radiación ultravioleta del sol (Lin & Fisher, 2007). Por otra parte, la elastasa es una metaloproteínasa encargada de degradar la elastina, la cual es una proteína conectiva encargada de brindar elasticidad a la piel y agrupar otras proteínas conectivas como el colágeno (Boran, 2018).

Se obtuvieron extractos a partir de un proceso de lixiviación convencional (LX) y extracción por fluidos supercríticos (FSC). Posteriormente se concentraron las antocianinas en extractos obtenidos por LX y FSC, a través del uso de la resina de adsorción XAD-7HP, los cuales fueron liofilizados al final del proceso. Además, se obtuvieron liofilizados de los extractos crudos obtenidos por ambas técnicas de extracción. Al evaluar el potencial inhibitorio *in vitro* de la tirosinasa, tanto el extracto concentrado obtenido por lixiviación (LX-P) como el de fluidos supercríticos (SFC-P) presentaron un potencial inhibitorio relevante (**Tabla 5**). En el caso de la enzima elastasa, el extracto LX-P presentó un potencial inhibitorio alto, seguido por el extracto SFC-P. Por lo anterior, se puede concluir que el proceso de concentración de las antocianinas incrementó el potencial inhibitorio de los extractos en estas enzimas relacionas al envejecimiento prematuro.

La exposición constante a la radiación ultravioleta del sol y a las partículas contaminantes del medio ambiente generan procesos inflamatorios en la dermis (Cao *et al.*, 2020). Debido a esto, se opta por añadir ingredientes

antiinflamatorios en distintas formulaciones de productos cosmecéuticos (Baumann, 2018). Se evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos concentrados y crudos obtenidos de dos accesiones (CH-01 y CH-15) donde la accesión de frijol pinto (PB) CH-01 presentó el mayor contenido de fenoles totales (Alcázar-Valle *et al.*, 2020). El extracto PB presentó una mayor inhibición en la enzima COX-2 en comparación a los extractos obtenidos de frijol negro tanto concentrado como crudo (**Tabla 5**). La inhibición de COX-2 está relacionada al tratamiento de inflamaciones crónicas en distintos tejidos, por lo que es un blanco potencial para reducir el proceso inflamatorio en el tejido dérmico (Fonseca *et al.*, 2023). También se evaluó el potencial inhibitorio de los extractos hacia la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual produce óxido nítrico (NO) para la defensa del organismo ante patógenos. Sin embargo, durante la inflamación crónica la sobreproducción de NO puede generar daños al organismo (Cinelli *et al.*, 2020). El extracto de frijol negro CH-15 concentrado a través de la resina XAD-7HP presentó una mayor inhibición de la enzima iNOS a comparación de los extractos crudos (**Tabla 5**). Estos resultados nos indican que los extractos ricos en compuestos fenólicos poseen potencial antiinflamatorio para ser usados como ingredientes en la formulación de productos cosmecéuticos.

Tabla 5. Inhibición de las enzimas tirosinasa, elastasa, COX-2 y iNOS

Potencial Cosmecéutico			
Análisis	Extracto	IC ₅₀ (mg/mL)	Referencia
Tirosinasa	FSC – P	0.147 ± 0.02 ^a	Fonseca et al., 2021
	LX – P	0.143 ± 0.02 ^a	
	FSC – C	9.92 ± 1.73 ^a	
	LX – C	2.59 ± 0.22 ^b	
Elastasa	FSC – P	0.023 ± 0.07 ^a	
	LX – P	0.005 ± 0.01 ^b	
	FSC – C	0.142 ± 0.01 ^a	
	LX – C	0.105 ± 0.01 ^b	

Potencial Antiinflamatorio			
Análisis	Extracto	IC ₅₀ (µg/mL)	Referencia
COX-2	BB – P	26.9 ± 8.0 ^B	Fonseca et al., 2023
	BB – C	94.4 ± 7.6 ^C	
	PB – P	10.5 ± 2.3 ^A	
	PB – C	33.1 ± 7.6 ^B	
iNOS	BB – P	62.6 ± 16.3 ^A	
	BB – C	111.6 ± 14.6 ^B	
	PB – P	76 ± 7.6 ^{AB}	
	PB – C	84.3 ± 22 ^{AB}	

Extracción por fluidos supercríticos (FSC), extracción por lixiviación convencional (LX), extracto concentrado (P), extracto crudo (C), frijol negro (BB, CH-15), frijol pinto (PB, CH-01). Las letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre procesos de extracción a través de la prueba t de Student (p<0.05). Las letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre accesiones de frijol criollo y métodos de extracción mediante la prueba de ANOVA con tukey post hoc (p<0.05).

Conclusiones

Se colectaron 56 accesiones de frijol de los municipios productores de Chiapas, Oaxaca y Guerrero, siendo el estado de Chiapas en el que se encontró una mayor diversidad de especies. Las accesiones de frijol criollo colectadas en la región Pacífico Sur ofrecen una amplia variedad de compuestos fenólicos igualando o superando las concentraciones reportadas de estos compuestos bioactivos en otras variedades de frijol comercial. Dichas concentraciones y presencia de compuestos fenólicos son importantes para su uso y aplicación a través de la generación de nuevos productos alimentarios y su uso como ingredientes funcionales para el desarrollo de productos cosmecéuticos y/o nutraceuticos debido a su actividad antioxidante, anti-inflamatoria y antienvjecimiento.

Referencias

- Agostini-Costa, T.S., Teodoro, A. F. P., Alves, R. B. N., Braga, L. R., Ribeiro, I. F., Silva, J. P., Quintana, L. P., & Burle, M. L. (2015). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian genebank. *Ciencia Rural Santa Maria*, 45, 335–341. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140030>.
- Akillioglu, H. G., & Karakaya, S. (2010). Changes in total phenol, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. *Food Science and Biotechnology*, 19, 633–639.
- Akond, G M., Khandaker, L., Berthold, J., Gates, L., Peters, K., Delong, H., & Hossain, K. (2011). Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food Technology*, 6, 385–394.
- Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Reyes-Ramírez, H., Enríquez-Vara, J. N., & García-Morales, S. (2020). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Antinutritional Content of Legumes: A Comparison between Four *Phaseolus* Species. *Molecules*, 25, 3528. <https://doi.org/10.3390/molecules25153528>.
- Alcázar-Valle, M., García-Morales, S., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Sánchez-Osorio, E., Flores-López, L., Enríquez-Vara, J. N., & Lugo-Cervantes, E. (2021). Nutritional, Antinutritional Compounds and Nutraceutical Significance of Native Bean Species (*Phaseolus* spp.) of Mexican Cultivars. *Agriculture*, 11, 1031.
- Baumann, L. (2018). How to Use Oral and Tropical Cosmeceuticals to Prevent and Treat Skin Aging. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 26 (4), 407–413. <https://doi.org/101016/j.fsc.2018.06.002>
- Boccellino, M., D'Angelo, S. (2020). Anti-Obesity Effects of Polyphenol Intake: Current Status and Future Possibilities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5642. <https://doi.org/10.3390/ijms21165642>
- Boran, R. (2018). Investigations of anti-aging potential of *Hypericum origanifolium* Willd for skincare formulations. *Industrial Crops*

- and Products*, 118 (March), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.058>
- Cao, C., Xiao, Z., Wu, Y., & Ge, C. (2020). Diet and skin aging-from the perspective of food nutrition. *Nutrients*, 12 (3), 1-25. <https://doi.org/10.3390/nu12030870>.
- Capistrán-Carabarin, A., Aquino-Bolaños, E. N., García-Díaz, Y. D., Chávez-Servia, J. L. Vera-Guzmán, A. M., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2019). Complementarity in Phenolic Compounds and the Antioxidant Activities of *Phaseolus coccineus* L. and *P. vulgaris* L. Landraces. *Foods*, 8, 295. <https://doi.org/10.3390/foods8080295>.
- Carbas, B., Machado, N., Oppolzer, D., Ferreira, L., Brites, C., Rosa, A. S. E., & Barros A., I. R. N. A. (2020). Comparison of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for the determination of nutritional and antinutritional parameters in common beans. *Food Chemistry*, 306, 125509. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125509>
- Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules*, 22, 1360. <https://doi.org/10.3390/molecules22081360>
- Chen, C., Somavat, P., Singh, V., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Chemical characterization of proanthocyanidins in purple, blue, and red maize coproducts from different milling processes and their anti-inflammatory properties. *Industrial Crops and Products*, 109, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.046>
- Chung, W.G., Miranda, C.L., Stevens, J.F., & Maier, C.S. (2009). Hop proanthocyanidins induce apoptosis, protein carbonylation, and cytoskeleton disorganization in human colorectal adenocarcinoma cells via reactive oxygen species. *Food Chemical Toxicology*, 47, 827–836. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.015>
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., & Silverman, R. B. (2020). Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulations, Structure, and Inhibition. *Physiology & Behavior*, 40 (1), 139-148. <https://doi.org/10.1002/med.21599>. inducible

- Contreras, J., Herrera-González, A., Arrizon, J., Lugo-Cervantes, E., & Mojica, L. (2020). Mexican Endemic Black Bean Phenolic Extract Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential. *Current Developments in Nutrition*, 4 (2), 382. https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa045_015
- Contreras, J., Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Luna-Vital, D. A., & Mojica, L. (2023). Mexican Native Black Bean Anthocyanin-Rich Extracts Modulate Biological Markers Associated with Inflammation. *Pharmaceuticals*, 16, 874. <https://doi.org/10.3390/ph16060874>
- Del Toro-Sánchez, C. L., Gutiérrez-Lomelí, M., Lugo-Cervantes, E., Zurita, F., Robles-García, M. A., Ruiz-Cruz, S., Aguilar, J. A., Morales del Rio, J. A., & Guerrero-Medina, P. J. (2015). Storage effect on phenols and the antioxidant activity of extracts from *Anemopsis californica* and inhibition of elastase enzyme. *Journal of Chemistry*, 602136. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/602136>.
- Dia, V.P., Berhow, M., & Gonzalez-De Mejia, E. (2008). Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11707–11717. <https://doi.org/10.1021/jf802475z>
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2045–2052. <https://doi.org/10.1021/jf051706l>.
- Díaz, A. M., Caldas, G. V., & Blair, M. W. (2010). Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International*, 43, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.014>.
- Espinosa-Pérez, E. N., Ramírez-Vallejo, P., Crosby-Galván, M. M., Estrada-Gómez, J. A., Lucas-Florentino, B., & Chávez-Servia, J. L. (2015). Classification of common dry bean landraces from the south-center of Mexico by seed morphology. *Revista Fitotécnica Mexicana*. 29, (1), 29-38.

- Fonseca Hernández, D., Lugo Cervantes, E., Luna-Vital, D. A., & Mojica, L. (2020). Food-derived bioactive compounds with anti-aging potential for nutricosmetic and cosmeceutical products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0 (0), 1-16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.185407>
- Fonseca Hernández, D., Lugo-Cervantes, E., Escobedo Reyes, A., y Mojica, L. (2021). Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Phenolic Extract Exhibits Antioxidant and Anti-Aging Potential. *Molecules*, 26 (6716), 14. https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa040_024
- Fonseca Hernández, D., Mojica, L., Berhow, M. A., Brownstein, K., Lugo Cervantes, E., & Gonzalez de Mejia, E. (2023). Black and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) unique mexican varieties exhibit antioxidant and anti-inflammatory potential. *Food Research International*, 169 (March, 14, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112816>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>
- Gençdağ, E., Özdemir, E. E., Demirci, K., Görgüç, A., & Yılmaz, F. M. (2022). Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. *Current Plant Biology*, 29, 100238. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2022.100238>
- Grela, E. R., Kiczorowska, B., Samolinska, W., Matras, J., Kiczorowski, P., Rybinski, W., & Hanczakowska, E. (2017). Chemical composition of leguminous seeds: part I-content of basic nutrients, amino acids, phytochemical compounds, and antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 243, 1385-1395. DOI: 10.1007/s00217-017-2849-7.
- Goshi, E., Zhou, G., & He, Q. (2019). Nitric oxide detection methods *in vitro* and *in vivo*. *Medical Gas Research*. 9, 192–207. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.273957>
- Hsieh-Lo, M., Castillo-Herrera, G., & Mojica, L. (2020) Black Bean Anthocyanin-Rich Extract from Supercritical and Pressurized Extraction

- Increased *In Vitro* Antidiabetic Potential, While Having Similar Storage Stability. *Foods*, 9 (5), 655. <https://doi.org/10.3390/foods9050655>
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Yun, H.J., Han, E.H., Kim, H.G., Kim, J.Y., Park, B.H., Khanal, T., Choi, J.M., Chung, & Jeong, H. (2011). Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.002>
- Kowalski, R., & Gonzalez de Mejia, E. (2021). Phenolic composition, antioxidant capacity and physical characterization of ten blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars, their juices, and the inhibition of type 2 diabetes and inflammation biochemical markers. *Food Chemistry*, 359, 129889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129889>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 20, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Lin, J. Y., y Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445 (7130), 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>
- Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M. A., & González de Mejia, E. (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>
- Möller, M.N., Ríos, N., Trujillo, M., Radi, R., Denicola, A., & Álvarez, B. (2019). Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *Journal of Biology Chemistry*, 294, 14776–14802, <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>
- Sinkovic, L., Pipan, B., Sinkovic, E., & Meglic, V. (2019). Morphological seed characterization of common (*Phaseolus vulgaris* L.) and runner (*Phaseolus coccineus* L.) bean germplasm: a Slovenian gene bank example. *BioMed Research International*, 6376948. <https://doi.org/10.1155/2019/6376948>

- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>.
- Tan, J., Han, Y., Han, B., Qi, X., Cai, X., Ge, S., & Xue, H. (2022). Extraction and purification of anthocyanins: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*. 8, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100306>
- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Becerra, L., & Lugo-Cervantes, E. (2017). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed. *CyTA - Journal of Food*, 15, 489–496. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1297963>.
- Yang, Q. Q., Gan, R. Y., Ge Y. Y., Zhang, D., & Corke, H. (2018). Polyphenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): chemistry, analysis, and factors affecting composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 1518-1539. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12391>.