

Estudio de la capacidad antioxidante *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) mediante extracción asistida por microondas

Study of *in vitro* antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) by microwave assisted extraction

Miguel Angel Puertas Mejía,^I Nerly Mosquera-Mosquera,^I Benjamín Rojano^{II}

^I Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

^{II} Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) es una fuente nutricional importante en Colombia, que aporta un gran contenido de sustancias bioactivas con potencial benéfico para la salud, tales como polifenoles, entre otras, que contribuyen de manera sinérgica con sus propiedades terapéuticas, y que pueden tener un efecto positivo contra algunas patologías.

Objetivos: evaluar el método de extracción asistido por microondas como método alternativo para estudiar la capacidad antioxidante *in vitro* en ocho variedades de *P. vulgaris* L. cultivadas en Colombia.

Métodos: semillas sin piel de *P. vulgaris*, deshidratadas y maceradas se sometieron a extracción asistida por microondas y extracción sólido-líquido; el contenido de fenoles se evaluó por el método de *Folin-Ciocalteu* y el potencial antioxidante *in vitro* se evaluó con base en los métodos del radical estable catión radical difenil-picrilhidrazilo y el radical catión 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

Resultados: el método de extracción asistido por microondas realizada en horno microondas convencional fue más eficiente respecto a la convencional ya que disminuyó la cantidad de solvente, de muestra empleada y los tiempos de extracción. Los extractos obtenidos por extracción asistida por microondas en horno microondas convencional presentaron un contenido de fenoles entre 29,36 y 60,61 g EAG/L, mientras que el método extracción sólido-líquido, estuvo entre 32,75 y 113,27 g EAG/L. El efecto anti-radicalario fue similar entre los extractos evaluados.

Conclusiones: todos los extractos presentaron buena capacidad protectora contra radicales libres, y la técnica de extracción asistida por microondas en horno

microndas convencional puede ser usada como método alternativo para una valoración rápida, eficiente y eficaz del contenido de sustancias bioactivas en diferentes matrices, se presentó mínimas diferencias entre los resultados obtenidos, comparados con las metodologías de extracción asistida por microondas establecidas antes.

Palabras clave: extracción asistida por microondas en horno microondas convencional (MAE-HMO); *Phaseolus vulgaris* L.; polifenoles; semillas de frijol.

ABSTRACT

Introduction: *Phaseolus vulgaris* L. is a representative crop of nutrient and economic importance in Colombia. Additionally, *P. vulgaris* is considered as a natural source of bioactives compounds, such as polyphenols, which have been associated with valuable effects on health.

Objetives: to evaluate the microwave extraction assisted technique as an alternative methodology to study the antioxidant capacity of eight varieties of *P. vulgaris* cultivated in Colombia.

Methods: dehydrated and powered seeds of *P. vulgaris* was subjected to microwave assisted extraction and solid-liquid extraction and. Total phenolis content was determined by Folin-Cicoulteau method and the potential antioxidant was evaluated using diphenyl-picrylhydrazyl radical stable and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation assays.

Results: microwave assisted extraction-Household microwave oven technique was more efficient and versatile than SLE method. The extracts obtained microwave assisted extraction-Household microwave oven methodology showed polyphenol content ranged between entre 29,36 and 60,61 g EGA/L, but SLE was over 32,75 and 113,27 g EAG/L.

Conclusions: all extracts showed a considerable antioxidant potential against free radical, and microwave assisted extraction-Household microwave oven method could be used as an alternative method for fast, efficient and effective evaluation of the content of polyphenol in various matrices, with minimal differences comparing to established microwave assisted extraction techniques.

Key words: microwave assisted extraction-Household microwave oven (MAE-HMO); *Phaseolus vulgaris* L.; polyphenols; bean seeds.

INTRODUCCIÓN

El *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) representa una de las actividades agrícolas de mayor importancia en diferentes regiones de Colombia, ya que es una fuente importante de ingresos y empleo rural en sus zonas de siembra. Se cultiva por lo general en regiones tropicales, mediante técnicas tradicionales; su siembra forma parte de las actividades de subsistencia para pequeños agricultores, asociado con otros productos tales como maíz, algodón, yuca, palma africana, entre otros.¹ La producción nacional de *P. vulgaris* se concentra en la región andina con un 85 % de la producción total, son los principales departamentos productores Antioquia, Santander, Nariño, Huila, Tolima, Boyacá y Bolívar. Por otro lado, esta leguminosa también es conocida por su

elevado contenido de sustancias bioactivas tales como proteínas, aminoácidos, carbohidratos, saponinas, fibra dietética, alcaloides, flavonoides, antocianinas, entre otras,²⁻³ los cuales contribuyen de manera sinérgica con sus propiedades terapéuticas tales como antioxidante, diurético, antiinflamatorias, antitumorales y antimicrobianas, que pueden tener un efecto positivo contra algunas enfermedades crónicas.⁴⁻⁵ Por ejemplo, el contenido de polifenoles, está relacionado con algunas características de los alimentos como son el sabor, color, palatabilidad y el valor nutricional.⁶ A pesar de los beneficios económicos que la especie *P. vulgaris* trae en la economía, su potencial aplicación con propiedades fitoterapéuticas, bien sea como fuente alternativa de sustancias funcionales o como ingrediente activo de productos de consumo humano ha sido relegado a un segundo plano.

Por otro lado, la extracción de polifenoles se realiza con frecuencia por técnicas tales como, extracción sólido-líquido (percolación), cromatografía en columna, soxhlet, entre otras; requieren el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos, de igual forma son procedimientos que consumen tiempo y producen gran cantidad de desechos nocivos.⁷⁻⁹ Una de las técnicas de preparación de muestras desarrollada en las últimas décadas y muy utilizada para muchos tipos de matrices, es la extracción asistida por la radiación de microondas. El calentamiento por la radiación de microondas fue usado en procesos de digestión ácida en condiciones atmosféricas, se redujo el tiempo de la preparación de la muestra de 2 h a menos de 15 min.¹⁰⁻¹²

Reciente, *David G. Stevenson* y colaboradores reportaron el uso de la técnica de extracción asistida por microondas en la determinación del contenido de polifenoles en un concentrado de avena, los autores encontraron un incremento significativo en el rendimiento de la extracción y la actividad antioxidante del extracto.¹³ Por tanto, de acuerdo a la importancia agrícola y nutricional de *P. vulgaris* en Colombia y a los pocos reportes del uso de la técnica de extracción asistida por microondas (MAE) en este tipo de matrices a nivel nacional y local, esta investigación planteó el uso del método MAE asistido por un horno de microondas casero (Microwave Assisted Extraction-Household Microwave Oven (MAE-HMO), para la rápida valoración del contenido de polifenoles y de la capacidad captadora de radicales, comparado con la extracción convencional sólido-líquido (ESL).

MÉTODOS

Material vegetal

Las variedades de *P. vulgaris* L (fríjol) evaluadas fueron cargamanto, bola roja, nima, radical, zaragoza, calima, cabecita negra y sabanero, todas obtenidas en el mercado local de la ciudad de Medellín, Antioquia, Colombia. La piel de los granos deshidratados de cada una de las especies fue desechada y se conservó la semilla a temperatura ambiente (c.a. 25 °C) y en la oscuridad.

Extracción asistida por microondas en horno microondas convencional (MAE-HMO)

Una muestra de 1,0 g de la semilla, antes deshidratada y macerada se adicionaron a 5,0 mL de metanol y la mezcla resultante se sometió a radiación de microondas, se usó un horno microondas convencional, a tiempos de exposición de la radiación de microondas de 40 y 60 s (con pulsos cada 5 s.) a potencia de 300, 500 and 700 watt.

El extracto obtenido se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se rotavaporó a sequedad. El extracto resultante se redisolvió en 1,0 mL de metanol y se guardó a 4 °C hasta los análisis posteriores. El solvente de extracción, los volúmenes de solvente, cantidad de muestra, tiempo y potencia de radiación de microondas descritos arriba, se basaron en los procedimientos optimizados previo. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA (Microsoft Excel 2010) con un nivel de significancia de $p < 0,001$.

Extracción sólido-líquido- (ESL)

Una muestra de 5,0 g de la semilla sin piel, antes deshidratada y macerada se adicionó en 25,0 mL de metanol grado analítico durante un periodo de 2 y 3 h con agitación constante a temperatura ambiente y en ausencia de luz para prevenir la degradación de los polifenoles. Luego, el extracto se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se rotavaporó a sequedad. El extracto resultante se redisolvió en 1,0 mL de metanol y se guardó a 4 °C hasta los análisis posteriores.

Evaluación capacidad antioxidante

Contenido de fenoles totales

Se determinó con base en el método de Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones. Una alícuota de 50 μ L de los extractos, se mezcló con 125 μ L de reactivo de Folin – Ciocalteu, 425 μ L de H₂O desionizada y 400 μ L de solución saturada de carbonato de sodio. Después de una hora de reacción, se midió la absorbancia a 760 nm y los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de ácido gálico por litro de solución.

Ensayo de radical estable difenil-picrilhidrazilo (DPPH)

La capacidad antioxidante de cada fracción en diferentes concentraciones se determinó de acuerdo con la metodología descrita por *Pereira y Tavano*¹⁴ con pequeñas modificaciones y se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH. En resumen, una alícuota (0,1 mL) de cada muestra (con la dilución necesaria) se adicionó a 1,0 mL de una solución etanólica de DPPH (73,5 μ M). De inmediato después, se midió la absorbancia a 514 nm y luego cada 15 s. los primeros dos minutos, luego, cada 30 s hasta los 5 min, y al final en intervalos de 1 minuto hasta la obtención del estado estacionario en la reacción o una disminución en la absorbancia menor del 10 %. La concentración inicial exacta del DPPH en el medio de reacción se determinó mediante una curva de calibración de soluciones de DPPH (2,5 a 100 μ M) medidas a 514 nm. Los resultados se expresaron en términos de la concentración efectiva al 50 % (EC₅₀) en g extracto/ μ mmol DPPH. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo catión radical 2,2´-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), ABTS

Después, 10 μ L de una dilución apropiada de los extractos y 1500 μ L de la solución del radical ABTS se mezclaron y se dejaron reaccionar por 6 min e de inmediato la absorbancia se midió a 734 nm. Para correlacionar los resultados de absorbancia se

realizó una curva de calibración con soluciones Trolox (6-Hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcromane-2-acido carboxílico) en concentraciones 0,2; 0,5; 1,5 y 2;0 mM. Los resultados se expresaron en términos de TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) en $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto seco.

Análisis estadístico

Los valores mostrados en las tablas corresponden al promedio \pm las desviaciones estándares de tres mediciones en paralelo. Los datos de la EC_{50} y TEAC se calcularon a partir de curvas de calibración. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA (Microsoft Excel 2010) con un nivel de significancia de $p < 0,001$.

RESULTADOS

En la figura se muestran los datos del contenido de fenoles obtenido con los diferentes parámetros de extracción evaluados. Se evidencia que aunque ambos métodos recuperan cantidades de fenoles muy similares, la extracción MAE-HMO, es más eficiente en la obtención de compuestos bioactivos, ya que emplea menor tiempo de extracción y menor consumo de solvente orgánico (hasta menos del 80 %) comparado con la extracción convencional sólido líquido. El método ESL degrada dichos compuestos en la medida en que el tiempo de extracción es mayor a 3 h.

Luego, con base en éstos resultados, los parámetros establecidos para el método de extracción MAE-HMO fueron: Volumen de solvente: 5 mL; tiempo de extracción (segundos): 60s; potencia de extracción: 300 watts. Por otro lado, los parámetros empleados para la ESL fueron 3 h de agitación, 25 mL de solvente y 5 gramos de muestra.

En la tabla se muestran los datos de capacidad antioxidante como secuestradores de radicales libres de los diferentes extractos de *P. vulgaris* y se correlacionan con el contenido de polifenoles. El contenido de fenoles en los extractos MAE-HMO de las variedades cargamanto, nima, y zaragoza fue mayor que aquellos obtenidos por ESL. Por otro lado, la capacidad antiradical de los extractos MAE-HMO, se correlaciona con el CFT encontrado en las variedades cargamanto, nima, y zaragoza.

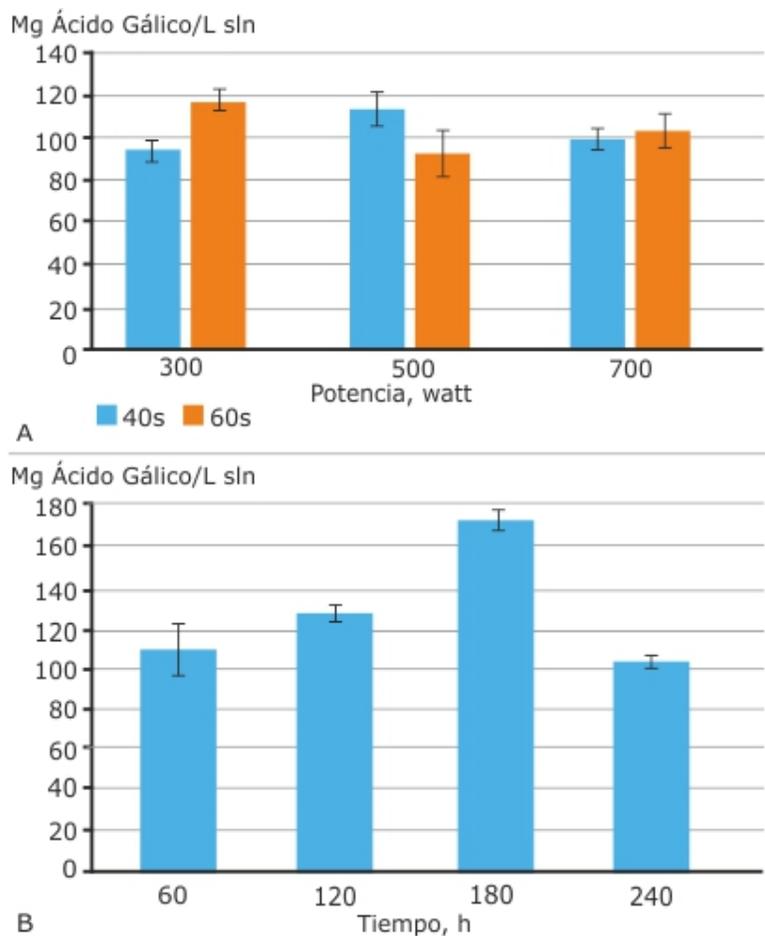


Fig. Comparación del contenido de fenoles totales mediante. **A).** MAE-HMO y **B).** ESL, en *P. vulgaris* L., var. Cargamanto rojo.

Tabla. Comparación del contenido de polifenoles y el efecto antioxidante en ocho variedades de *P. vulgaris* mediante MAE-HMO y SLE

<i>P. vulgaris</i> variedades	Fenoles totales (mg EAG/L)*		EC ₅₀ (g ext/μmmol DPPH)**		TEAC (μmol Trolox/g MS)***	
	MAE-HMO	SLE	MAE-HMO	SLE	MAE-HMO	SLE
Cargamanto	35,82±0,69 ^a	35,19±0,45 ^a	0,58±0,03 ^a	0,75±0,03 ^b	1,90±0,01 ^a	0,94±0,03 ^b
Bola roja	28,48±0,29 ^a	59,85±0,52 ^b	0,69±0,05 ^a	0,76±0,07 ^b	1,55±0,02 ^a	1,15±0,05 ^b
Cabecita negra	41,66±0,36 ^a	49,38±0,27 ^b	0,59±0,03 ^a	0,89±0,04 ^b	1,74±0,03 ^a	1,21±0,04 ^b
Nima	52,44±0,45 ^a	35,60±0,73 ^b	0,58±0,04 ^a	0,78±0,04 ^b	1,78±0,04 ^a	0,66±0,09 ^b
Radical	60,61±0,31 ^a	113,27±1,30 ^b	0,79±0,03 ^a	0,79±0,04 ^a	1,85±0,02 ^a	2,29±0,03 ^b
Zaragoza	35,73±0,47 ^a	32,75±0,69 ^b	0,83±0,01 ^a	0,83±0,04 ^a	1,69±0,01 ^a	1,34±0,04 ^b
Calima	29,36±0,36 ^a	60,35±0,73 ^b	0,79±0,05 ^a	0,77±0,02 ^a	1,70±0,01 ^a	1,34±0,02 ^b
Sabanero	41,60±2,86 ^a	44,19 ± 0,85 ^b	0,62±0,09 ^a	0,62±0,01 ^a	1,64±0,01 ^a	1,23±0,01 ^b

* Contenido de fenoles totales, mg ácido gálico/L muestra.

** Concentración efectiva a 50 %, g extracto/μmmol DPPH.

*** Trolox equivalent antioxidant capacity, μmol Trolox/g material seco. Promedio en la misma fila con la misma letra no difiere significativamente (p < 0,05).

DISCUSIÓN

El contenido de compuestos bioactivos como carotenoides, vitaminas (C, E, D, etc.), entre otros, presentes en las plantas, es muy variado y por tanto pueden contribuir de manera sinérgica con la capacidad antioxidante de los mismos, por lo cual resulta bastante complejo evaluar la capacidad antiradical de la planta a través de sus componentes individuales. Por lo anterior, en este trabajo además de presentar un método rápido, económico y eficiente para la obtención de polifenoles, éstos se correlacionaron con la capacidad antioxidante mediante los métodos del radical estable DPPH y el radical catión ABTS.

En las diferentes variedades de *P. vulgaris* evaluadas, el tipo y contenido de polifenoles producen una diferencia importante en sus propiedades funcionales y por tanto podrían incrementar su uso como posible fuente de aditivos para la industria farmacéutica y de alimentos, con una actividad antioxidante prominente, además de sus propiedades farmacológicas y terapéuticas reportadas.

La técnica MAE-HMO evaluada en esta investigación como metodología analítica alternativa para la obtención de polifenoles presentes en 8 variedades de *P. vulgaris*, mostró una mayor eficiencia en la extracción con respecto a la ESL, ya que disminuyó muy considerable la cantidad de solvente, de muestra empleada y los tiempos de extracción. Los resultados de la presente investigación indicaron que la capacidad antioxidante medida en todos los extractos se podría correlacionar en parte, con el contenido de polifenoles, de acuerdo, por lo natural, que esta propiedad no se puede asociar directo con una sola clase de componente o familia de componentes, tal y como se observó con la var. cargamanto rojo que presentó una EC₅₀ similar a la var. nima, (0,58 ± 0,03 y 0,58 ± 0,04 g extracto/μmol DPPH, al respecto), pero su contenido de

polifenoles fue inverso proporcional al determinado para el nima ($35,82 \pm 0,69$ y $52,44 \pm 0,45$ mg/L EAG), lo que permite inferir que la presencia de otros compuestos pueden afectar de manera positiva o negativa la capacidad antioxidante en los extractos evaluados.

Los resultados obtenidos con el método MAE-HMO presentados en este estudio son similares a aquellos reportados por *Sutivisedsak* y colaboradores,¹⁵ al tener en cuenta que en la investigación se empleó un horno microondas casero. Por lo tanto, la presente metodología podría ser usada como un método preliminar para la búsqueda bio-dirigida de diferentes compuestos bioactivos, sin invertir grandes cantidades de dinero en equipos de alto costo.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación, al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), y a la Universidad de Antioquia, (*proyecto IN632CE*). Todos los experimentos fueron realizados bajo las normas y leyes colombianas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias-Restrepo JH, Rengifo-Martínez T, Jaramillo-Carmona M. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol Voluble. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Bogotá: CTP Print Ltda; 2007.
2. Geil P, Anderson J. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J Am Coll Nutr.* 1994;13(6):549-58.
3. Mishra SB, Rao CV, Ojha SK, Vijayakumar M, Verma A. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *Internat J Pharmacol Sci Res.* 2010;1(1):29-44.
4. Díaz AM, Caldas GV, Blair MW. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Res Internat.* 2010;43 (2):595-601.
5. Lin L-Z, Harnly JM, Pastor-Corrales MS. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 2008;107(1):399-410.
6. Padilla FC, Rincón AM. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Arch Latinoam Nutr.* 2008;58(1):303-8.
7. Buldini PL, Ricci L, Sharma JL. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *J Chromatogr A.* 2002;975(1):47-70.
8. Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trend Anal Chem.* 2003;22(4):232-44.
9. Smith RM. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A.* 2003;1000(1-2):3-27.
10. Bose AK, Banik BK, Lavlinskaia N, Jayaraman M, Manhas MS. More chemistry in microwave. *ChemTech.* 1997;27(9):18-23.

11. LeBlanc G. Microwave-accelerated techniques for solid sample extraction. LC-GC 1999;17(1):30-7.
12. Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. J Chromatogr A. 1986;371(1):299-306.
13. Stevenson DG, Inglett GE, Chen D, Chena D, Biswasb A, Ellerc FJ, et al. Phenolic content and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide-treated and air-classified oat bran concentrate microwave-irradiated in water or ethanol at varying temperatures. Food Chem. 2008;108(1);23-30.
14. Pereira MP, Tavano OL. Use of different spices as potential natural antioxidant additives on cooked beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content. Plant Foods Hum Nutr. 2014;69(4);337-43.
15. Sutivisedsak N, Cheng HN, Willett JL, Willett JL, Lesch WC, Tangsrud RR, et al. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Res Internat. 2010;43(2);516-9.

Recibido: 22 de enero de 2015.

Aprobado: 30 de octubre de 2015.

Miguel Puertas-Mejía. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.
Correo electrónico: mpuertas@exactas.udea.edu.co