

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Potencial Nutracéutico y Capacidad Antioxidante De Genotipos De Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Por:

PATSY DAYANA GUERRERO ESPINOZA

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Potencial Nutracéutico y Capacidad Antioxidante De Genotipos De Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Por:

PATSY DAYANA GUERRERO ESPINOZA

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:



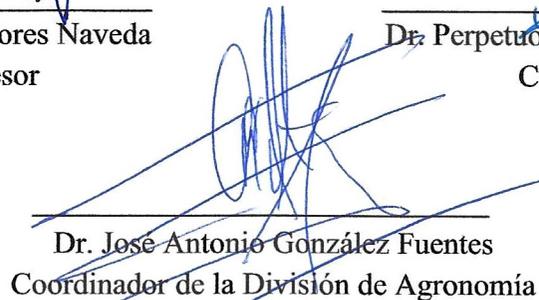
Dr. Josué Israel García López
Asesor Principal



Dr. Antonio Flores Naveda
Coasesor



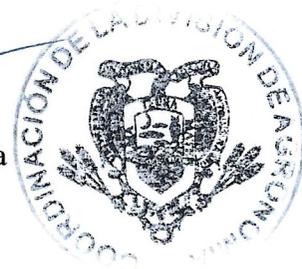
Dr. Perpetuo Álvarez Vázquez
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2022



DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Patsy Dayana Guerrero Espinoza

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**, la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** y al **Departamento de Fitomejoramiento** por brindarme la oportunidad de crecer, de aprender y de formarme como profesional.

A mis **padres María Magdalena Espinoza** y **José Antonio Guerrero Carreño**, por todo el amor con el que me criaron, por brindarme un hogar amoroso y cálido, por motivarme a cumplir mis metas, por enseñarme a ser una mujer fuerte e independiente, por siempre apoyarme y aconsejarme, por aplaudir mis logros y mostrarme mis errores para poder mejorar siempre, gracias por todo.

A **Marco Antonio Cueto López**, por su amor y apoyo incondicional, por acompañarme a lo largo de este trayecto.

Al **Dr. Josué Israel García López** por confiar en mí para desarrollar este tema, por brindarme su apoyo en este proyecto, orientarme y por estar ahí siempre con la mejor disposición para ayudarnos. Excelente asesor.

Al **Dr. Antonio Flores Naveda** por ser un excelente maestro, por tener siempre la disponibilidad, transmitirnos sus conocimientos y brindarnos su apoyo.

A mis **Maestros**, por ser parte de mi formación académica, por transmitirme sus conocimientos y algunos de ellos brindarme su amistad y consejos.

A **Rosa Delia Robledo**, por ser una muy buena e incondicional amiga, por brindarme su cariño y apoyo, acompañarme a lo largo de estos últimos años y animarme siempre que lo necesite.

A mis **amigos**, quienes llenaron mis días de alegría y me apoyaron de una u otra forma.

DEDICATORIA

A mis **padres, María Magdalena Espinoza y José Antonio Guerrero**, por ser los mejores papas del mundo, por su amor, confianza, esfuerzos y sacrificios, sin ustedes no sería la persona en la que me he convertido, por darme tanto amor y cariño, por sus consejos, por siempre estar cuando más lo necesité, por creer en mí, por alentarme a ser una mejor persona, por motivarme a lograr todo lo que me propusiera y por siempre demostrar lo orgullosos que están de mí, innumerables gracias. Los amo inmensamente.

A mi **hija Elaine Victoria**, el motor y la luz de mi vida, por motivarme a ser una mejor persona y superarme cada día, por toda esa alegría que me das. Te amo.

A mi **viejita Victoria Cornejo**, por ser una madre para mí, por sus consejos y cuidados, por el inmenso amor que me ha dado, por apapacharme siempre y corregirme cuando es necesario.

A mis **hermanos** y compañeros de vida, **Cristian y Christopher Guerrero**, por siempre estar conmigo, por ser mis confidentes y mi apoyo.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo.....	2
1.2 Hipótesis.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Importancia del frijol en México.....	3
2.2. Diferentes pigmentaciones en el frijol.....	4
2.3. Concentración de compuestos polifenólicos en frijol.....	4
2.4. Métodos de capacidad antioxidante.....	7
2.4.1. Método de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)/ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS.....	7
2.4.2 Método de Capacidad Antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Genotipos de frijol.....	10
3.2 Preparación de la muestra para análisis de fitoquímicos.....	10
3.3 Extracción de compuestos fenólicos.....	10
3.4 Determinación de fenoles totales.....	10
3.5 Determinación de flavonoides totales.....	11
3.6 Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS.....	11
3.7 Análisis estadístico y diseño experimental.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1 Concentración de fenoles totales en genotipos de frijol.....	12
4.2 Concentración de flavonoides totales en genotipos de frijol.....	13

4.3 Capacidad antioxidante medida por DPPH	15
4.4 Capacidad antioxidante medida por ABTS.....	16
5. CONCLUSIONES	18
6. LITERATURA CITADA	19

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza del contenido de fenoles totales y las propiedades antioxidantes en genotipos de frijol.	12
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam <i>et al.</i> 2013).....	9
Figura 2. Concentración de fenoles totales en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).	13
Figura 3. Concentración de flavonoides totales en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$)......	14
Figura 4. Capacidad antioxidante medida por DPPH en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$)......	15
Figura 5. Capacidad antioxidante medida por ABTS en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$)......	16

RESUMEN

El frijol ha sido parte integral de la dieta mexicana durante miles de años. Dentro del país, existen una serie de genotipos que poseen propiedades físicas y químicas muy diversas. Los genotipos de frijol que actualmente se cultivan en México, representan una fuente considerable de nutrientes y compuestos bioactivos. El objetivo del trabajo de investigación, fue determinar la concentración de polifenoles y la capacidad antioxidante de genotipos de frijol consumidas y producidas en el Sureste de Coahuila, México.

Durante la investigación, se llevó a cabo la determinación de fenoles totales, flavonoides totales, y la capacidad antioxidante medida por los métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) y ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). En general, se pudo identificar una variabilidad considerable en el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante entre los genotipos en estudio. En cuanto al contenido de fenoles totales se obtuvo una concentración de 107.35 a 241.91 mg GAE/100 g, mientras que el contenido de flavonoides totales oscilo de 8.43 a 42.07 mg CE/ 100 g.

Para la capacidad antioxidante por DPPH, se identificaron rangos de 65.24 a 167.03 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, y para ABTS de 106,76 a 178,88 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$. La mayor capacidad antioxidante, se presentó en los genotipos con mayor concentración de polifenoles. Los resultados, permiten evidenciar que existen diferencias entre los genotipos en estudio en cuanto a la concentración de polifenoles y sus propiedades antioxidantes.

Palabras clave: Fenoles totales; flavonoides totales; capacidad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*), constituye un alimento vegetal ancestral y tradicional cuyo origen va desde América Latina hasta México (Teixeira-Guedes *et al.*, 2019). El frijol, es reconocido como una leguminosa con buena fuente de proteínas, además de ser bajo en grasa, rica en fibra dietética y almidón (Suárez-Martínez *et al.*, 2016). Por otra parte, entre sus beneficios se encuentra su concentración de micronutrientes, donde se incluyen minerales y vitaminas, así como, compuestos bioactivos incluyendo oligosacáridos, lectinas, saponinas, fitatos y compuestos fenólicos (Hernández, 2012).

El color de la semilla de frijol, está determinado por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, como glucósidos de flavonoles, antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas). Sin embargo, el grupo de flavonoides más difundido en los frijoles son las proantocianidinas (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). Los granos de frijol con testa pigmentada, contienen más compuestos fenólicos con potencial antioxidante contra DPPH y radicales hidroxilo (Fang *et al.*, 2011).

En México, existe una gran variabilidad en la semilla de frijol, el color y el tamaño de la semilla son las dos características de calidad más importantes para los consumidores. Sin embargo, la industria del frijol ha basado su producción en cuatro variedades (negros bayos, pintos y peruanos), obligando a los consumidores a adquirir una de las variedades mencionadas sin opción de elegir otra con mayor contenido de compuestos bioactivos para la salud humana (Licea *et al.*, 2010). Por lo anterior, es importante conservar e identificar genotipos de frijol con una alta concentración de polifenoles y propiedades nutraceuticas, además de potencial para su comercialización a nivel nacional.

1.1 Objetivo

Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS en seis genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados en el Sureste de Coahuila.

1.1.2 Objetivos específicos

Establecer comparativamente cuál de los seis genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene mayor contenido de compuestos fenólicos totales.

Establecer comparativamente cuál de los seis genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene mayor capacidad antioxidante.

1.2 Hipótesis

Hi: El contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante, variará entre los genotipos de frijol en estudio.

Ho: El contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante no presentará diferencias entre los genotipos de frijol en estudio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del frijol en México

México, como parte de Mesoamérica, es considerado como uno de los centros de origen más importantes del mundo de varios tipos de frijol del género *Phaseolus*, entre ellos el que más destaca por su valor comercial es *Phaseolus vulgaris* (Fernández-Valenciano *et al.*, 2017). La gran diversidad de climas y nichos ecológicos, así como culturales de nuestro país, llevó durante este gran período de la historia a que se desarrollaran una gran diversidad de tipos de frijoles: negros, azulados, flores, bayos, pintos, ayacotes, espolón, ibes, cambas, y muchos otros más, lo cual constituye un mercado muy variado en cuanto a preferencias y precios (Reyes-Rivas *et al.*, 2008).

México, es el país con mayor diversidad de frijol, encontrándose una amplia variedad de ellos dentro del territorio nacional, sin embargo, resaltan por su importancia económica y su valor comercial cinco variedades de mayor demanda: negro, pinto, flor de mayo y flor junio, mayocoba y bayo (Aguirre-Santos *et al.*, 2010). Licea *et al.* (2010), reportan que el 35.8% prefiere el frijol negro; 26.6% prefiere claros destacando mayocoba, flor de mayo y flor de junio; y 14.8% prefiere pinto nacional e importado.

En México, el frijol es un alimento de suma importancia por el consumo per cápita en el país y considerado un alimento funcional (Herrera-Hernández *et al.*, 2018). Actualmente, el papel de esta leguminosa sigue siendo fundamental en lo económico, porque representa para la economía campesina una fuente importante de ocupación e ingreso, así como una garantía de seguridad alimentaria vía autoconsumo; mientras que en la dieta representa, la principal y única fuente de proteínas para algunos sectores de la población mexicana. Se considera que alrededor de 570,000 productores primarios se dedican a este cultivo siendo la segunda actividad en importancia después del maíz, por otra parte, como generador de empleo es un factor importante en la economía del sector primario (Morales-Santos *et al.*, 2017).

2.2 Diferentes pigmentaciones en el frijol

Existe gran diversidad de colores en frijoles nativos, estos pueden tener granos de color uniforme, así como granos de dos colores y de tres o más colores, además pueden presentar pigmentos de un color diferente al predominante (Morales, 2018). Los compuestos fenólicos están representados principalmente por taninos y flavonoides y son mayormente acumulados en la capa o testa de semillas donde contribuyen a la determinación del color (Herrera-Hernández *et al.*, 2018). Los frijoles comunes y en general las especies de *Phaseolus* exhiben una amplia variedad de colores y patrones de la capa de semillas, por lo que han sido el tema de la mayoría de los estudios publicados sobre composición y abundancia de las diferentes clases de compuestos fenólicos en especies de leguminosas. (Sparvoli *et al.*, 2015).

2.3 Concentración de compuestos polifenólicos en frijol

Los compuestos fenólicos del frijol han sido motivo de estudio, debido a que son metabolitos secundarios que poseen un anillo aromático que generalmente contiene uno o más grupos hidroxilo que les permite tener propiedades antioxidantes (Sivaci y Dunam, 2014). Los compuestos fenólicos constituyen una amplia gama de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8000 compuestos distintos (Aguirre-Santos y Gomez-Aldapa, 2010). Los compuestos fenólicos es el grupo más numeroso y ampliamente distribuido en la naturaleza. Además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónicas, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, etc. (Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos que se encuentran comúnmente en el frijol incluyen flavonoides, antocianinas, flavonoides, iso-flavonas, flavanonas, proantocianidinas y taninos, así como una amplia gama de ácidos fenólicos (Suárez-Martínez *et al.*, 2016). Los compuestos fenólicos primarios en frijol y en sus testas son principalmente ácidos fenólicos como ácido p -cumárico, ácido ferúlico y ésteres del ácido sinápico (Silva-Cristobal *et al.*, 2010).

Clases comerciales de frijol han sido diferenciadas por la presencia de tres antocianinas (delfinidina, petunidina y malvidina) en frijol negro, 16 kaempferol en frijol pinto, y quercetina y kaempferol en frijoles rosados, mientras que no se detectaron flavonoides en frijoles de testa blanca (Luthria y Pastor-Corrales *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2009). Martínez *et al.* (2003), determinaron que el frijol negro Jamapa posee 3 compuestos fenólicos mayoritarios: delfinidina (47%), petunidina (22%) y malvidina (15%), todas glucosidadas. Para la variedad mayocoba se identificó un solo compuesto mayoritario, el kaempferol. Para el caso de los ácidos fenólicos, se han identificado tanto en frijol crudo como en frijol procesado, el ácido gálico, catequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico y ácido cumárico, siendo el ácido gálico y la catequina los más abundantes.

Reynoso *et al.* (2007), mencionaron que los compuestos fenólicos de cuatro variedades de frijol mexicano de mayor demanda actúan como antioxidantes e inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Los ácidos fenólicos presentes en esta leguminosa se derivan de los ácidos benzoico y cinámico (Saleem *et al.*, 2016). Dentro del primer grupo (ácidos hidroxibenzoicos) se encuentran compuestos como el ácido gálico, p-hidroxibenzoico y vanílico; en el segundo grupo (ácidos hidroxicinámicos) están el ácido cumárico, cafeico y ferúlico (Vidak *et al.*, 2015). Todos estos ácidos se encuentran en forma esterificada, glicosilada y polimerizada (Luthria y Pastor-Corrales, 2006).

Dentro de la subdivisión de los polifenoles el grupo más importante es el de los flavonoides que consisten en un gran grupo de sustancias de bajo peso molecular, derivados de benzo- γ -pirano (Vidak *et al.*, 2015). La característica estructural básica es el núcleo flavano (2-fenil-benzo- γ -pirano), un sistema de dos anillos de benceno A y B, unidos por un oxígeno que contiene el anillo pirano C (Leopodini, *et al.*, 2011). El frijol es rico en kaempferol, un flavonoide de bajo peso molecular formado por la combinación de derivados de fenilalanina y ácido acético con un esqueleto de difenilpirano. Entre los beneficios para la salud de los flavonoides, se encuentra el efecto antioxidante, la quelación de metales, inhibición enzimática y la regulación genética (Porras y López, 2009). Hay una relación específica entre las estructuras y su actividad antioxidante, tanto mayor sea el número de grupos hidroxilo en el núcleo flavonoide, mayor será la actividad antioxidante; y también la

relación específica entre la estructura y sus actividades antimutagénicas, ya que el bloqueo de los grupos hidroxilo mediante acetilación o alquilación disminuye esta actividad (Herrera-Hernández *et al.*, 2018).

En las semillas de frijol el grupo de mayor distribución de flavonoides son las antocianinas y sólo se han reportado en las semillas de frijol de color negro y azul-violeta (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005).

Los flavonoides presentes en el frijol tienen una buena actividad antioxidante ya que tanto las antocianinas como los flavonoides tienen sustituciones 3' 4' ortodihidroxi en el anillo B, otra característica que les aporta una buena actividad antioxidante son las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7 (Cámara *et al.*, 2013).

Existen cinco clases de flavonoides en legumbres, flavan-3-oles, flavanones, flavonoles, isoflavones y antocianidinas (Sida-Arreola *et al.*, 2015). Todas las clases de flavonoides tienen efecto beneficioso para la salud, así como importantes funciones fisiológicas en las legumbres, en donde el tipo, la cantidad y la localización de muchas de ellas estarán influenciadas por las especies de plantas y la etapa de desarrollo de los tejidos (Dias *et al.*, 2019). Fueron detectados por HPLC ácidos fenólicos como ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ésteres del ácido sináptico (Campos-Vega *et al.*, 2009).

Los flavonoides se pueden clasificar en subclases: flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavononas, antocianinas y proantocianidinas (Luthria y Pastor-Corrales, 2006). La familia de los estilbenos incluye varios compuestos entre los que destacan el resveratrol, pterostilbeno y el piceatannol, caracterizados por un doble enlace de los anillos fenólicos. Los taninos, se dividen en dos grupos, condensados e hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de flavonoides y los hidrolizables contienen ácido gálico o compuestos similares, esterificados con un hidrato de carbono (Leopodini, 2011). En la naturaleza son comunes en diversos tejidos de plantas incluyendo hojas, tallos, raíces, semillas y frutos, en el frijol se encuentran en la testa y son los responsables de la coloración de la semilla, sin embargo, la concentración de compuestos antioxidantes en los granos y/o semillas dependerá

de las condiciones de crecimiento del cultivo, además de la constitución genética (Flores-Naveda *et al.*, 2021).

2.4 Métodos de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se debe principalmente a las propiedades reductoras de los polifenoles, que desempeñan un papel importante en la neutralización o secuestro de radicales libres y en la quelación de metales de transición, actuando contra el inicio y la propagación de procesos oxidativos (Huber *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Ariza *et al.* (2013), atribuyen la actividad antioxidante de cinco cultivares de frijol común (*P. vulgaris*) a los flavonoides y taninos contenidos en extractos metanólicos de semilla, reportando una relación directa entre el color de la semilla, el contenido de compuestos fenólicos, y una mayor actividad antioxidante contra el radical DPPH.

Los antioxidantes pueden desactivar los radicales mediante dos mecanismos principales: transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y transferencia de electrones (TE). El resultado final es el mismo, independientemente del mecanismo, pero la cinética y el potencial de reacciones secundarias difieren. La energía de disociación de enlaces y el potencial de ionización son dos factores principales que determinan el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes (Prior *et al.*, 2005).

Los métodos basados en TAH miden la capacidad clásica de un antioxidante para remover los radicales libres mediante la donación de hidrógeno (AH = cualquier donante de H). Mientras que los métodos basados en TE detectan la capacidad de un antioxidante potencial para transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluido metales, carbonilos y radicales. Las reacciones TE dependen del pH, y casi siempre ocurre junto al TAH en todas las muestras (Prior *et al.*, 2005).

2.4.1 Método de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)/ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS

Este método utiliza un espectrofotómetro de matriz de diodos para medir la pérdida de color cuando se agrega un antioxidante al cromóforo azul-verde ABTS•+ (ácido 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (Alam *et al.*, 2013). Pisoschi y Negulescu (2011), mencionan que el ABTS puede ser oxidado por persulfato de potasio o dióxido de manganeso, dando lugar al radical catiónico ABTS (ABTS•+) cuya disminución de la absorbancia a 734 nm es monitoreada en presencia de Trolox, elegido como antioxidante estándar. Aunque el ensayo TEAC generalmente se clasifica como un método basado en TE, el mecanismo TAH también se aplica. La extensión de la decoloración del color azul-verdoso, cuantificada como una disminución de la absorción a 20 734 nm, depende de la duración de la reacción, la capacidad antioxidante intrínseca y la concentración en la muestra (Shahidi y Zhong, 2015).

2.4.2 Método de Capacidad Antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es ampliamente utilizado en la evaluación de propiedades antioxidantes, debido a su notable estabilidad y a su color intenso (Montoya *et al.* 2009).

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable, debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece (Mishra *et al.*, 2012).

El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH• ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a

conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos, requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Mishra *et al.*, 2012).

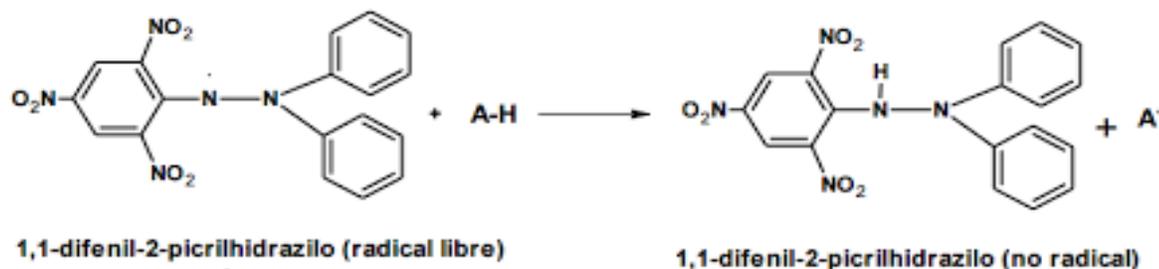


Figura 1. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam *et al.*, 2013).

Los resultados del ensayo DPPH* se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC50), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH* al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC50 cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH* usado (Deng *et al.*, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Genotipos de frijol

Los genotipos de frijol en estudio provienen del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). El frijol se cultivó durante el ciclo agrícola primavera-verano 2020, en el Campo Experimental Bajío UAAAN en Saltillo, Coahuila localizado a 25° 21' 29" Latitud N, 101° 02' 21" Longitud O, a una altitud de 1742 m s.n.m., con una precipitación media anual de 350-400 mm y una temperatura media anual de 19.8 °C.

3.2 Preparación de la muestra para análisis de fitoquímicos

Cien gramos de grano (endospermo y salvado) de cada genotipo de frijol fueron molidos en un molino eléctrico KRUPS GX4100 (Medford, MA, USA), después se tamizaron para obtener partículas con tamaño <0.5 mm (malla estándar 35). Posteriormente, la harina fue utilizada para realizar la extracción y cuantificación de polifenoles y propiedades antioxidantes.

3.3 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo con Rodríguez-Salinas *et al.* (2019). Para la extracción, se pesaron 200 mg de harina de frijol, los cuales fueron suspendidos con 4 mL de metanol al 80%, se purgaron durante 30 s con argón y se agitaron durante 2 h a 200 rpm, en oscuridad. Después, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

3.4 Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como patrón para la curva de calibración (0 a 200

mg/L). La absorbancia de las muestras se midió a 750 nm, y los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalente por cien gramos de muestra (mg GAE/100 g).

3.5 Determinación de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales se basó en la reacción del complejo de cloruro de aluminio e hidróxido de sodio, utilizando como estándar de referencia (+)-catequina a una concentración de 0 a 200 mg/L. La absorbancia de las muestras se midió a 510 nm y el resultado se reportó como miligramos equivalentes de (+)-catequina por 100 gramos de muestra (mg CE/100 g).

3.6 Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS

Los ensayos de capacidad antioxidante para DPPH y ABTS se realizaron de acuerdo con Camposeco-Montejo *et al.* (2021). Los resultados fueron reportados en microcromoles de Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) equivalentes por cien gramos de muestra ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$), tomando como referencia la curva de calibración de Trolox (0 a 500 $\mu\text{mol/L}$).

3.7 Análisis estadístico y diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño completo al azar, con tres repeticiones. Los resultados se analizaron con un ANOVA en el paquete estadístico SAS versión 9.1, con una prueba comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados se informaron como valores medios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican diferencias significativas en cuanto al contenido de polifenoles y las propiedades antioxidantes entre los de genotipos de frijol (Cuadro 1). Las diferencias se pueden deber a las diferentes pigmentaciones del grano, donde se encuentra la mayoría de los pigmentos que dan propiedades antioxidantes. En el siguiente apartado, se describe a detalle los resultados obtenidos.

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza del contenido de fenoles totales y las propiedades antioxidantes en genotipos de frijol.

FV	GL	FEN TL (mg GAE/100 g)	FLAV TL (mg CE/100 g)	DDPH (μmol TE/100 g)	ABTS (μmol TE/100 g)
Genotipos	6	8670.43**	376.71**	5205.51**	2981.18**
Error	14	133.06	2.78	24.98	24.47
C V (%)		7.07	7.67	4.47	3.31

*, ** = Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente: FV = Fuentes de variación; GL = Grados de libertad; CV = Coeficiente de variación; FEN TL = Fenoles totales; FLAV TL = Flavonoides totales; DPPH = 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl; ABTS = 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

4.1 Concentración de fenoles totales en genotipos de frijol

La mayor concentración de fenoles totales se presentó en los genotipos AN-01 y AN-06 (con concentraciones de 241, 91 mg GAE/100 g y 216,71 mg GAE/100 g, respectivamente), seguidos de AN-05 y AN-04 (174,66 mg GAE/100 g y 173,51 mg GAE/100 g, respectivamente), mientras que la menor concentración se presentó en los genotipos AN-07, AN-03, AN-02 (115,52 mg GAE/100m g, 111,71 mg GAE/100 g y 107,35 mg GAE/100 g, respectivamente) sin presentar diferencia significativa entre estos últimos ($p > 0.05$).

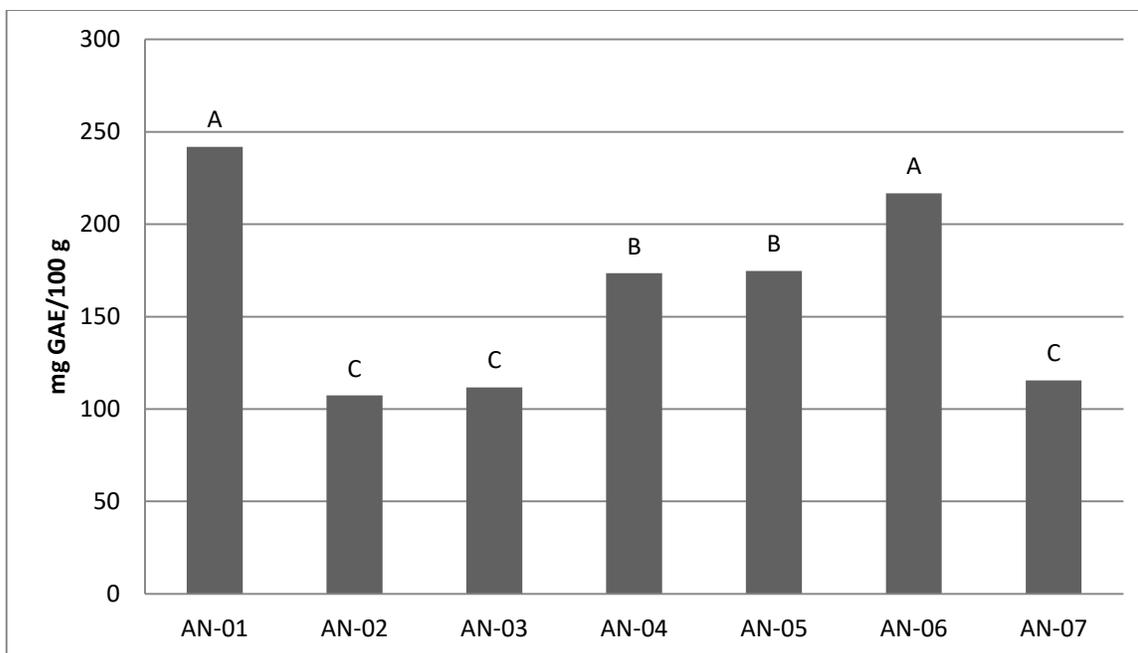


Figura 2. Concentración de fenoles totales en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos son cercanos a los informados por Kan *et al.* (2017), quienes reportan concentraciones de fenoles totales en un rango 0.25 a 2.38 mg EAG/g en 26 variedades de frijol Kidney. Los compuestos fenólicos dominantes presentes en las leguminosas son flavonoides, ácidos fenólicos y procianidinas. En general, las legumbres con los contenidos de compuestos fenólicos más elevados son las variedades pigmentadas como rojas y negras, y están asociadas directamente con la capacidad antioxidante (Amarowicz y Pegg, 2008; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

4.2 Concentración de flavonoides totales en genotipos de frijol

La concentración de flavonoides totales mostró valores en un rango de 8.34 mg CE/100 g a 42.07 mg CE/100 g. La mayor concentración de flavonoides totales se observó en el genotipo AN-07 (42,07 mg CE/ 100 g), seguido de AN-01 (28,69 mg CE/100 g), mientras que los valores más bajos se presentaron en AN-02 y AN-3 (12,55 mg CE/ 100 g y

8,43 mg CE/100 g, respectivamente), sin presentar diferencia significativa entre estos últimos ($p \leq 0.05$).

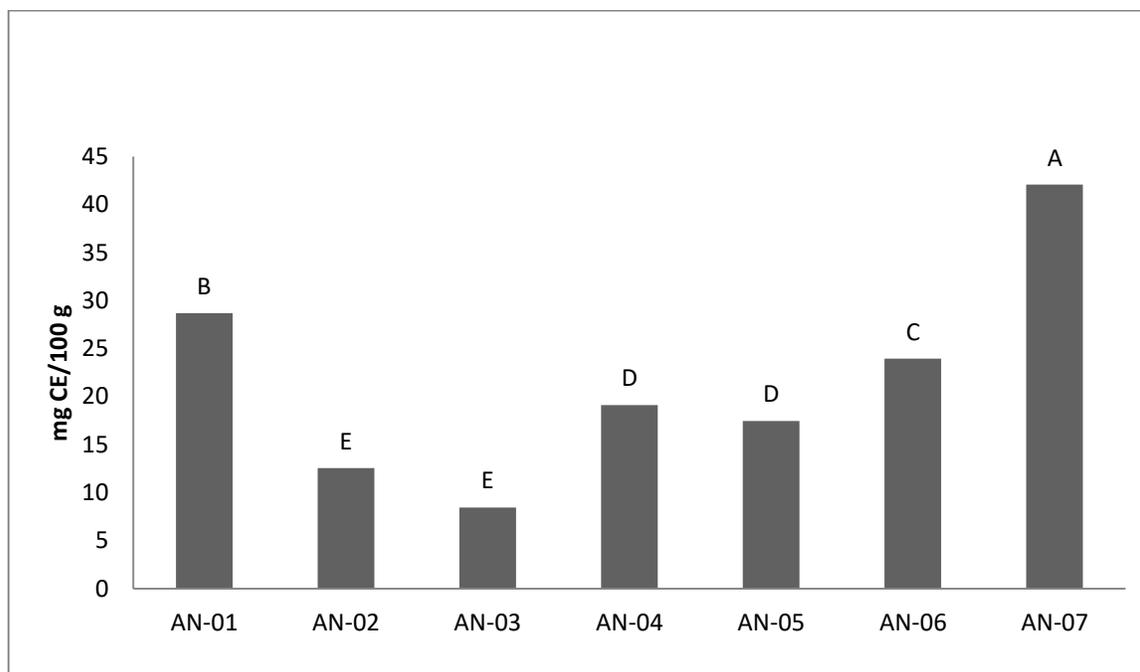


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias ($n = 3$). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Aquino-Bolaños *et al.* (2016), reportan valores de contenido de flavonoides que oscilan entre 5.9 a 21.5 mg CE/g. Otras investigaciones han reportado valores de flavonoides totales en frijol común de 24 mg EC/100 g a 143 mg EC/100 g, resultados discrepantes a los obtenidos en el presente trabajo (Heimler *et al.*, 2005). De acuerdo con Spartvoli *et al.* (2015), los compuestos fenólicos están representados principalmente por taninos y flavonoides, y son mayormente acumulados en la capa o testa de semillas donde contribuyen a la determinación del color.

4.3 Capacidad antioxidante medida por DPPH

La mayor capacidad antioxidante por DPPH se presentó en los genotipos AN-01 y AN-06 (167,03 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ y 162,06 $\mu\text{mol TE}/100$, respectivamente), seguido por AN-04 y AN-05 (120,39 $\mu\text{mol TE}/100$ y 115,17 $\mu\text{mol TE}/100$, respectivamente), mientras que los niveles más bajos se obtuvieron en AN-03 y AN-02 (71,51 $\mu\text{mol TE}/100$ y 65,24 $\mu\text{mol TE}/100$, respectivamente), presentando una diferencia significativa entre estos últimos dos genotipos.

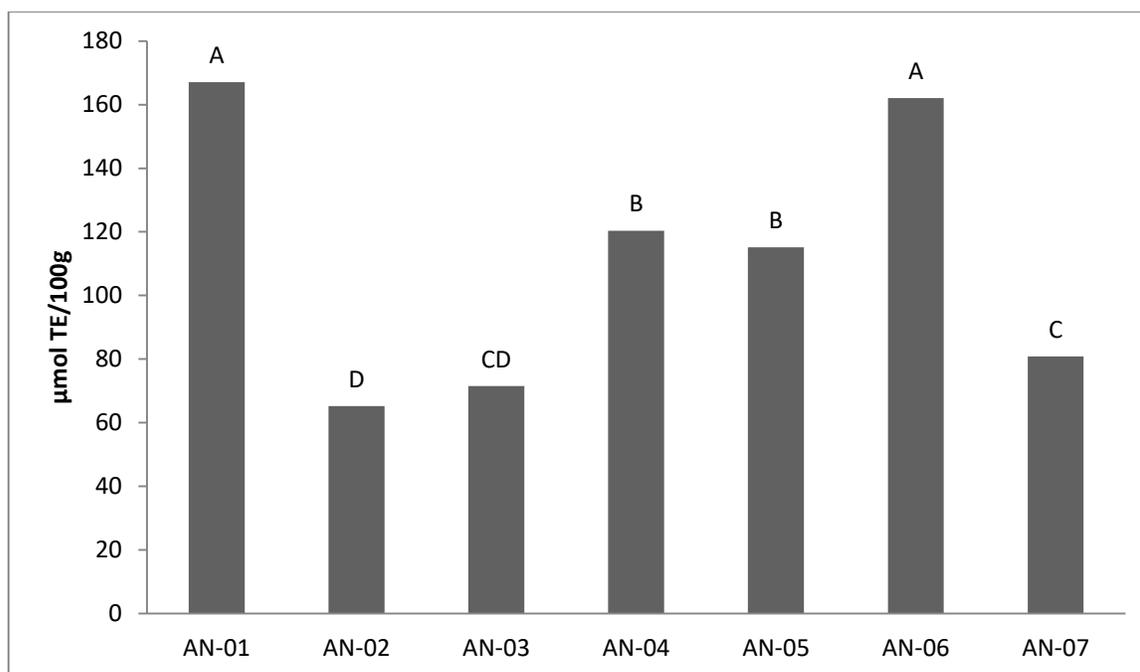


Figura 4. Capacidad antioxidante medida por DPPH en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias ($n = 3$). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Magallanes (2021), reporta valores en un rango de 6.90 a 9.14 $\mu\text{mol ET}$ por gramo de muestra en base seca. Mientras que Silva *et al.* (2017) reportaron como capacidad antioxidante del frijol Pinto empleando DPPH valores de 33.38 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$. La capacidad antioxidante en cereales, está estrechamente relacionada con la concentración de polifenoles en alguna de las estructuras externas del grano, mismas que brindan color o pigmentación (Flores-Naveda *et al.*, 2021).

4.4 Capacidad antioxidante medida por ABTS

La mayor capacidad antioxidante por ABTS se observó en el genotipo AN-06 (181,44 $\mu\text{mol TE}/100$), seguido de AN-01 y AN-04 (178,88 $\mu\text{mol TE}/100$ g y 169,19 $\mu\text{mol TE}/100$, respectivamente), mientras que la menor capacidad antioxidante por ABTS se presentó en el genotipo AN-02 (106,76 $\mu\text{mol TE}/100$), presentando diferencias altamente significativas en comparación a los genotipos antes mencionados ($p \leq 0.05$).

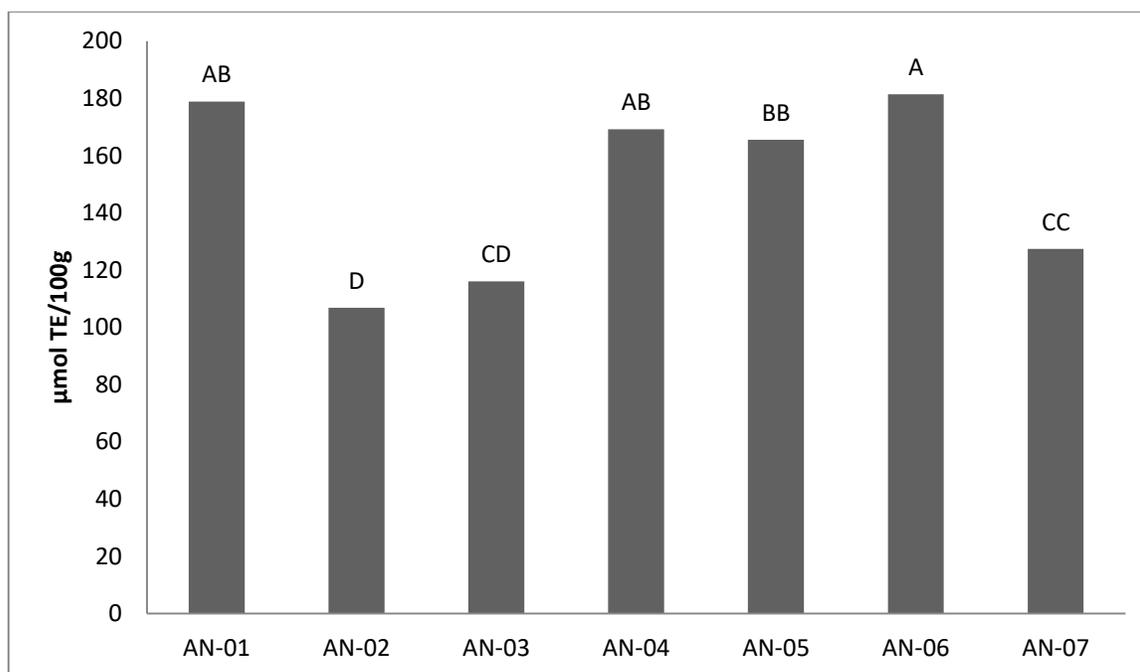


Figura 5. Capacidad antioxidante medida por ABTS en genotipos de frijol. Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias ($n = 3$). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los genotipos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

De acuerdo con Silva *et al.* (2017), el método ABTS muestra correlaciones más fuertes con compuestos fenólicos que el método DPPH, debiéndose al tipo de compuestos fenólicos determinados. Magallanes (2021), reporta para la capacidad antioxidante empleando ABTS valores en un rango de 10.44 a 13.64 $\mu\text{mol ET}/\text{g}$ muestra en base seca,

resultados similares al rango 4.21 - 6.40 $\mu\text{mol ET/g}$ para cuatro cultivares de frijol común (Weidner *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

Los resultados, permiten identificar que existe variabilidad entre los genotipos de frijol en cuanto a la concentración de fenoles totales y flavonoides totales.

Los genotipos que presentaron los valores más altos de concentración de fenoles totales y flavonoides totales, presentaron una mayor capacidad antioxidante para los ensayos de DPPH y ABTS.

6. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Santos, E.A., y Gomez-Aldapa, C.A. 2010. Evaluación de las características fisicoquímicas en la especie de frijol *Phaseolus vulgaris* de las variedades; pinto saltillo, bayo victoria y negro San Luis. *Revista Salud Pública y Nutrición. Ed. Especial*, 9-2010.
- Alam, M.N., Bristi, N.J., and Rafiquzzaman, M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.
- Amarowicz, R., and Pegg, R.B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 865-878.
- Aparicio-Fernandez, X., Yousef, G.G., Loarca-Pina, G., De Mejia, E., and Lila, M.A. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(11), 4615-4622.
- Aquino-Bolaños, E.N., García-Díaz, Y.D., Chavez-Servia, J.L., Carrillo-Rodríguez, J.C., Vera-Guzmán, A.M., and Heredia-García, E. 2016. Anthocyanins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 581-588.
- Ariza, T.D.J., Aceves, G.E.B., Sotelo, M.R., and Fernández, J.Y. 2013. Methanolic extracts antioxidant and antimicrobial activities from five varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Engineering Research and Technology [Internet]. ESRSA Publications*.
- Câmara, C.R., Urrea, C.A., and Schlegel, V. 2013. Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: implications on human health. *Agriculture*, 3(1), 90-111.

- Camposeco-Montejo, N., Flores-Naveda, A., Ruiz-Torres, N., Álvarez-Vázquez, P., Niño-Medina, G., Ruelas-Chacón, X., and García-López, J.I. 2021. Agronomic performance, capsaicinoids, polyphenols and antioxidant capacity in genotypes of habanero pepper grown in the southeast of Coahuila, Mexico. *Horticulturae*, 7(10), 372.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J.A., Guzman-Maldonado, S.H., Paredes-Lopez, O., and Loarca-Piña, G. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59-T65.
- Deng, J., Cheng, W., and Yang, G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430-1435.
- Dias, M.I., Carocho, M., Barros, L., and Ferreira, I.C.F.R. 2019. Phenolic compounds: flavonoids in legumes. In *Legumes* (pp. 49-83).
- Espinosa-Alonso, L.G., Lygin, A., Widholm, J.M., Valverde, M.E., and Paredes-Lopez, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12), 4436-4444.
- Fang, M., Lee, S.Y., Park, S.M., Choi, K.C., Lee, Y.J., Cho. 2011. Anti-inflammatory potential of *Phaseolus calcaratus* Roxburgh, an oriental medicine, on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 120–128.
- Fernández-Valenciano, A.F., y Sánchez Chávez, E. 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova scientia*, 9(18), 133-148.
- Flores-Naveda, A., Díaz-Vázquez, F., Ruiz-Torres, N.A., Vázquez-Badillo, M.E., Niño-Medina, G., Camposeco-Montejo, N., y García-López, J.I. 2021. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en líneas experimentales de sorgo pigmentado cultivado en Coahuila México.

- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., and Romani, A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3053-3056.
- Herrera-Hernández, I.M., Armendáriz-Fernández, K.V., Muñoz-Márquez, E., Sida-Arreola, J.P., and Sánchez, E. 2018. Characterization of bioactive compounds, mineral content and antioxidant capacity in bean varieties grown in semi-arid conditions in Zacatecas, Mexico. *Foods*, 7(12), 199.
- Huber, K., Brigide, P., Bretas, E., and Canniatti-Brazaca, S. 2016. Phenolic Acid, Flavonoids and Antioxidant Activity of Common Brown Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Before and After Cooking. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6(5), 1–7.
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Cui, S. W., Li, Y., and Xie, M. 2017. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 467-477.
- Leopoldini, M., Russo, N., and Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- Licea, G.R., Salazar, J.A.G., Rebollar, S., and Contreras, A.C.C. 2010. Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. *Paradigma económico*, 2(1), 121-145.
- Luthria, D.L., and Pastor-Corrales, M.A. 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of food composition and analysis*, 19(2-3), 205-211.

- Magallanes Lévano, K.J. 2021. Caracterización físicoquímica, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de cinco localidades, Lima-Ica.
- Martinez, P.A.H., Naranjo, F.A., y Nugaray, A.J. 2003, September. Antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos presentes en frijol negro Querétaro y Mayocoba y su estabilidad durante el cocimiento industrial. In *Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/trabajos/area_vi/cartel/cvi-2*.
- Mishra, K., Ojha, H., and Chaudhury, N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Montoya, C.G., Ospina, C.C., Mesa, N.S., Cano, C.M., Arias, M.L., García, P.G. y Rojano, B. 2009. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519-528.
- Morales, J.L. 2018. Clasificación de poblaciones nativas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando aprendizaje automático sobre histogramas de color (Doctoral dissertation, Universidad Veracruzana. Centro de Investigación en Inteligencia Artificial. Región Xalapa).
- Morales-Santos, M.E., Peña-Valdivia, C.B., García-Esteva, A., Aguilar-Benítez, G., y Kohashi-Shibata, J. 2017. Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*, 51(1), 43-62.
- Pisoschi, A.M., and Negulescu, G.P. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Porras A., y López, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos, Programa de Doctorado en Ciencias de Alimentos*, 121-134.

- Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Reyes-Rivas, E., Padilla-Bernal, L.E., Pérez-Veyna, O., y López-Jáquez, P. 2008. Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigación Científica Nueva Época*, 56, 1-21.
- Reynoso, C.R., Ríos, U.M.C., Torres, P.I., Acosta, G.J.A., Palomino, S.A.C., Ramos, G. M., y Guzmán, S.H. 2007. El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agric. Téc. Méx*, 33(1), 43-52.
- Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gomez, M., and Loarca-Pina, G. 2006. Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Research Signpost). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 217–36.
- Rodríguez-Salinas, P.A., Zavala-García, F., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Heredia, J.B., and Niño-Medina, G. 2020. Chromatic, nutritional and nutraceutical properties of pigmented native maize (*Zea mays* L.) genotypes from the northeast of Mexico. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(1), 95-112.
- Ross, K.A., Beta, T., and Arntfield, S.D. 2009. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113(1), 336-344.
- Saleem, Z.M., Ahmed, S., and Hasan, M.M. 2016. *Phaseolus vulgaris* linn.: botany, medicinal uses, phytochemistry and pharmacology. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(11), 1611-1616.
- Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

- Shahidi, F., and Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Sida-Arreola, J.P., Sánchez-Chávez, E., Ávila-Quezada, G.D., Zamudio-Flores, P.B., and Acosta, M.C. 2015. Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. *Plant, Soil and Environment*, 61(12), 573-576.
- Silva, M.O., Brigide, P., Toledo, N.M.V.D., and Canniatti-Brazaca, S.G. 2017. Phenolic compounds and antioxidant activity of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to cooking. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21.
- Silva-Cristobal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., and Bello-Pérez, L.A. 2010. Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties. *Cyta–Journal of Food*, 8(1), 7-14.
- Sivaci, A., and Duman, S. 2014. Evaluation of seasonal antioxidant activity and total phenolic compounds in stems and leaves of some almond (*Prunus amygdalus* L.) varieties. *Biological Research*, 47(1), 1-5.
- Sparvoli, F., Bollini, R., and Cominelli, E. 2015. Nutritional value. In *Grain legumes* (pp. 291-325). Springer, New York, NY.
- Suárez-Martínez, S.E., Ferriz-Martínez, R.A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J.E., de la Torre Carbot, K., and García-Gasca, T. 2016. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. *CyTA-Journal of Food*, 14(1), 131-137.
- Teixeira-Guedes, C.I., Oppolzer, D., Barros, A.I., and Pereira-Wilson, C. 2019. Impact of cooking method on phenolic composition and antioxidant potential of four varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. *LWT*, 103, 238- 246.

Vidak, M., Malešević, S., Grdiša, M., Šatović, Z., Lazarević, B., and Carović-Stanko, K. 2015. Phenotypic diversity among croatian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80(3), 133-137.

Weidner, S., Król, A., Karamać, M., and Amarowicz, R. 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), 373-380.