

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



BIOACCESIBILIDAD DE LOS FLAVONOIDES DE SEMILLAS DE HABA (*Vicia faba* L.) Y SU EFECTO ANTIADIPOGÉNICO *IN SILICO*

POR:

DEISY SOSA DE LEÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MAYO, 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



“BIOACCESIBILIDAD DE LOS FLAVONOIDES DE SEMILLAS DE HABA (*Vicia faba* L.) Y SU EFECTO ANTIADIPOGÉNICO *IN SILICO*”

**POR
L.N. DEISY SOSA DE LEÓN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**DIRECTOR
DR. JESÚS ALBERTO VÁZQUEZ RODRÍGUEZ**

**CO-DIRECTOR
DRA. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MAYO, 2022

DRA. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

P R E S E N T E:

Por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección de la tesis titulada: **“Bioaccesibilidad de los flavonoides de semillas de haba (*Vicia faba* L.) Y su efecto antiadipogénico *in silico*”**, presentada por el **LN Deisy Sosa de León** con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flamma Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a mayo de 2022

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Director

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Co-Director

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de Evaluación de Tesis **APROBÓ** la tesis titulada: “**Bioaccesibilidad de los flavonoides de semillas de haba (*Vicia faba* L.) y su efecto antiadipogénico *in silico*”**, presentada por el **LN Deisy Sosa de León** con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León a mayo de 2022

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Presidente

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Secretario

Dr. Luis Fernando Méndez López

Vocal

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

BIOACCESIBILIDAD DE LOS FLAVONOIDES DE SEMILLAS DE HABA (*Vicia faba* L.) Y SU EFECTO ANTIADIPOGÉNICO *IN SILICO*

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Presidente

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Secretario

Dr. Luis Fernando Méndez López

Vocal

DEDICATORIA

Para mi mamá, mi papá y mi hermano.

"Todo lo puedo en Cristo que me fortalece"

Flp 4:13

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme acompañado y guiado en todo momento, porque sin él nada es posible.

A mis padres, que siempre están apoyándome incondicionalmente y motivándome para esforzarme cada vez más. Gracias a ustedes he podido lograrlo todo. Los quiero demasiado.

A mi hermano Eddy, gracias por siempre ayudarme y apoyarme en todo, por estar al pendiente de mí en la distancia y darme muchos ánimos. Por ser mi ejemplo a seguir. Te quiero mucho.

A mis abuelos, mis tías: Claudia y Marissa, mis primos: Omar y Gabo, gracias por su apoyo.

A mi amigo Walter, gracias por estar todas las veces que lo necesite.

A mi mejor amiga Danne, gracias por brindarme tu apoyo, por escuchar todas mis historias y por estar al pendiente de mi trabajo.

A Sofi, que con sus audios alegra mis días.

A mis amigos: León, Jorge, Dalia, Anita y Chucho que siempre me tuvieron presente y se preocuparon por mí.

Al Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez, gracias por confiar en mi para la realización de este trabajo y por todas las enseñanzas y apoyo que me brindo.

A la Dra. Blanca Edelia González Martínez, gracias por todos los conocimientos y enseñanzas.

Al MCN. Abad López Hernández, gracias por todo el apoyo, la ayuda y la paciencia brindada, por resolver todas mis dudas.

A mis compañeros de la generación, gracias por el apoyo, por su amistad y por los momentos que compartimos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca que me permitió cursar satisfactoriamente el posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y a la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) por aceptarme como su estudiante y permitirme desarrollar este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES.....	7
3.1 Obesidad.....	7
3.2 Generalidades de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP β	9
3.2 Tratamientos alternativos.....	12
3.4 Importancia de las leguminosas.....	13
3.5 Generalidades del haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	14
3.5.1 Características del cultivo.....	14
3.5.1.1 Características biológicas.....	14
3.5.1.2 Producción del cultivo.....	15
3.5.2 Características nutricionales del haba.....	16
3.5.2.1 Compuestos fenólicos presentes en las semillas de haba.....	18
3.5.2.2 Flavonoides presentes en las semillas de habas.....	19
3.5.2.3 Bioaccesibilidad de los flavonoides.....	21
3.6 Modelos <i>in silico</i>	23
3.7 Efecto de los flavonoides sobre PPAR γ y C/EBP β	25
III. JUSTIFICACIÓN.....	27
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
VI. METODOLOGÍA.....	29
6.3 Procedimiento.....	30
6.3.1 Preparación de la muestra.....	30
6.3.2. Extracción de la fracción de flavonoides de las semillas de haba.....	30
6.3.3 Digestión <i>in vitro</i>	30
6.3.4 Determinación de polifenoles totales.....	31
6.3.6 Determinación de capacidad antioxidante.....	32
6.3.6.1 FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power).....	32
6.3.6.2 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).....	33

6.3.7 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles	33
6.4 Análisis <i>in silico</i>	34
6.5 Análisis estadístico.....	35
6.6 Ética.....	35
6.7 Implicaciones y medidas de bioseguridad	36
VII. RESULTADOS	37
7.1 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.....	37
7.1.1 Contenido de polifenoles totales	37
7.1.2 Contenido de flavonoides totales	38
7.1.3 Capacidad antioxidante	39
7.2 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles.....	41
7.3 Energía de unión ligando-receptor (PPAR γ y C/EBP β) <i>in silico</i>	46
VIII. DISCUSIÓN	50
8.1 Bioaccesibilidad de polifenoles totales de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión <i>in vitro</i>	50
8.2 Bioaccesibilidad de flavonoides totales de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión <i>in vitro</i>	52
8.3 Capacidad antioxidante de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión <i>in vitro</i>	53
8.4 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles.....	54
8.4 Energía de unión ligando-receptor (PPAR γ y C/EBP β)	57
IX. CONCLUSIONES.....	61
X. LIMITACIONES	62
REFERENCIAS	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación del índice de masa corporal según la Organización Mundial de la Salud.	8
Tabla 2 Áreas y total de producción.....	16
Tabla 3 Composición nutricional del haba (<i>Vicia faba</i> L.) madura y fresca en 100 gramos.	17
Tabla 4 Contenido de polifenoles en extracto de polifenoles de haba (<i>Vicia faba</i> L.), garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>) y chícharo (<i>Pisum sativum</i>).	18
Tabla 5 Contenido de flavonoides en habas, semillas frescas y maduras (mg/100g).	20
Tabla 6 Gradiente de elución	34
Tabla 7 Contenido y bioaccesibilidad de polifenoles totales en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión <i>in vitro</i>	37
Tabla 8 Contenido y bioaccesibilidad de flavonoides totales en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión <i>in vitro</i>	38
Tabla 9 Contenido y bioaccesibilidad de capacidad antioxidante en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión <i>in vitro</i>	40
Tabla 10 Contenido de compuestos fenólicos de haba madura y haba fresca en las distintas fases de la digestión <i>in vitro</i>	42
Tabla 11 Energías de unión y residuos de aminoácidos de unión entre ligando-receptor PPAR γ	46
Tabla 12 Energías de unión y residuos de aminoácidos de unión entre ligando-receptor C/EBP β	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la isoforma PPAR γ , cadena A y B.....	10
Figura 2 Participación de los receptores C/EBP α , β , δ y PPAR γ en el proceso de adipogénesis	11
Figura 3 Estructura de la isoforma C/EBP β , cadena A y B.....	12
Figura 4 Crecimiento y desarrollo de la planta de haba (<i>Vicia faba</i> L.)	15
Figura 5 Estructura de los flavonoides	20
Figura 6 Metabolismo de los flavonoides	23
Figura 7 Esquema general de la investigación.....	29
Figura 8 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: a) madura y b) fresca en polifenoles totales.....	38
Figura 9 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: a) madura y b) fresca en flavonoides totales.....	39
Figura 10 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: en FRAP a) madura y b) fresca y en DPPH c) madura y d) fresca.	41
Figura 11 Contenido de ácidos fenólicos de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g).....	44
Figura 12 Contenido flavanoles de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g).....	45
Figura 13 Contenido flavonoles de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g).....	45
Figura 14 Representación de la interacción específica de diferentes flavonoides presentes en las semillas de haba con PPAR γ	47
Figura 15 Representación de la interacción específica de diferentes flavonoides presentes en las semillas de haba con C/EBP β	49

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µM	Micromolar
mg	Miligramo
mm	Milímetro
g	Gramo
mL	Mililitro
mg/100g	Miligramo por cien gramos
min	Minuto
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
° C	Grados Celsius
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
H₂O	Agua
PBS	Buffer fosfato salino
CaCl₂	Cloruro de calcio
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
ET	Equivalentes de trolox
Å	Angstroms
FSS	Fluido similar a saliva
FSG	Fluido similar a fase gástrica
FSI	Fluido similar a fase intestinal
OMS	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisoma
C/EBP	proteína de unión del potenciador CCAAT

IMC	Índice de Masa Corporal
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Power
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Galato de epigallocatequina
EC	Epicatequina
C	Control sin digerir
FO	Fase oral
FG	Fase gástrica
FI	Fase intestinal
FB	Fase bioaccesible
HM	Haba madura
HF	Haba fresca

RESUMEN

El haba es una leguminosa consumida en todo el mundo en su forma madura o fresca. Es una importante fuente de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, a los cuales se les han atribuido efectos benéficos en diversas enfermedades como en la obesidad. Sin embargo, la fracción bioaccesibilidad de los flavonoides del haba en sus dos etapas de maduración y su efecto en los factores de transcripción que participan en la adipogénesis mediante un modelo *in silico* no ha sido totalmente estudiada. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiadipogénico *in silico* de los flavonoides bioaccesibles de las semillas maduras y frescas de haba.

Las muestras de haba madura y fresca fueron sometidas a un tratamiento térmico, posteriormente se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro*. Se cuantificaron polifenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante por el método de FRAP y DPPH en las diferentes fases de digestión (gástrica, intestinal, bioaccesible y control sin digerir). La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante el método HPLC-UV. Los compuestos fenólicos identificados y los factores de transcripción; receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ) y CCAAT/proteína de unión a potenciador beta (C/EBP β), involucrados en la adipogénesis, se sometieron a un análisis *in silico*.

El contenido de polifenoles y flavonoides totales obtenidos de las semillas de haba madura y fresca de la fase intestinal a la fase bioaccesible disminuyeron después de la digestión *in vitro*. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de bioaccesibilidad de los flavonoides totales se observaron diferencias significativas, siendo las semillas de haba madura las que presentan el mayor porcentaje en la fase bioaccesible con respecto al haba fresca (6.62% vs 1.78%). La capacidad antioxidante por el método de FRAP y DPPH en las semillas de haba madura y fresca de la fase intestinal (HM: 329.70 \pm 50.51, HF: 695.83 \pm 38.38 y HM: 311.54 \pm 38.14, 500.25 \pm 36.76 μ M ET/g, respectivamente) a la fase bioaccesible disminuyeron (HM: 122.67 \pm 13.70, HF: 327.41 \pm 88.37 y HM: 218.16 \pm 12.07, HF: 345.16 \pm 27.25 μ M ET/g,

respectivamente). El haba fresca presentó las mayores concentraciones de ácido gálico, epigallocatequina (EGC), catequina, epicatequina (EC), ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina 3- β -D-glucósido, y quercetina, en cambio, la concentración de rutina fue mayor en el haba madura. El contenido de EGC, catequina, rutina, quercetina y quercetina 3- β -D-glucósido en la fase bioaccesible mostró una diferencia significativa entre el haba madura y fresca, siendo la muestra de haba fresca la que presentó el mayor contenido de los flavonoides mencionados.

Los valores de energía de unión de PPAR γ y el ligando galato de epigallocatequina (EGCG) obtuvo el resultado más eficiente (-9.5 kcal/mol), formando puentes de hidrógeno con los residuos ARG280 y HIS266. Con respecto a C/EBP β , el ligando EC mostro un resultado de -4.43 kcal/mol y formó dos puentes de hidrógeno en los residuos GLU336 y LYS332.

En conclusión, las semillas de haba fresca sin digerir presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con respecto a las semillas de haba madura. Las semillas de haba madura presentan una mayor bioaccesibilidad después de la simulación gastrointestinal *in vitro*. El análisis *in silico* predijo el efecto antiadipogénico que poseen los flavonoides (EGCG y EC) presentes en semillas de haba maduras y frescas.

ABSTRACT

The fava bean is a legume consumed worldwide in its mature or fresh form. It is an important source of phenolic compounds, mainly flavonoids, which have been attributed beneficial effects in several diseases such as obesity. However, the bioaccessibility fraction of fava bean flavonoids in its two stages of maturation and its effect on transcription factors involved in adipogenesis using an *in silico* model has not been fully studied. The aim of the present study was to evaluate the *in silico* anti-adipogenic effect of bioaccessible flavonoids from mature and fresh fava bean seeds.

Mature and fresh fava bean samples were subjected to heat treatment, followed by *in vitro* gastrointestinal digestion. Total polyphenols, total flavonoids and antioxidant capacity were quantified by the FRAP and DPPH method in the different digestion phases (gastric, intestinal, bioaccessible and undigested control). The quantification of phenolic compounds was performed by the HPLC-UV method. The identified phenolic compounds and the transcription factors; peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP β), involved in adipogenesis, were subjected to *in silico* analysis.

The content of total polyphenols and flavonoids obtained from mature and fresh fava bean seeds from the intestinal to the bioaccessible phase decreased after *in vitro* digestion. However, as for the percentage of bioaccessibility of total flavonoids, significant differences were observed, with mature fava bean seeds having the highest percentage in the bioaccessible phase with respect to fresh fava bean (6.62% vs. 1.78%). The antioxidant capacity by FRAP and DPPH method in mature and fresh fava bean seeds of the intestinal phase (HM: 329.70 \pm 50.51, HF: 695.83 \pm 38.38 and HM: 311.54 \pm 38.14, 500. 25 \pm 36.76 μ M ET/g, respectively) to the bioaccessible phase decreased (HM: 122.67 \pm 13.70, HF: 327.41 \pm 88.37 and HM: 218.16 \pm 12.07, HF: 345.16 \pm 27.25 μ M ET/g, respectively). The fresh fava bean presented the highest concentrations of gallic acid, epigallocatechin (EGC), catechin, epicatechin (EC), chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin 3- β -D-glucoside, and quercetin, in contrast, rutin concentration was higher in the mature bean. The

content of EGC, catechin, rutin, quercetin, and quercetin 3- β -D-glucoside in the bioaccessible phase showed a significant difference between the mature and fresh fava bean, with the fresh fava bean sample having the highest content of the mentioned flavonoids.

The binding energy values of PPAR γ and epigallocatechin gallate ligand (EGCG) obtained the most efficient result (-9.5 kcal/mol), forming hydrogen bonds with residues ARG280 and HIS266. With respect to C/EBP β , the EC ligand showed a result of -4.43 kcal/mol and formed two hydrogen bonds at residues GLU336 and LYS332.

In conclusion, fresh undigested fava bean seeds presented higher content of phenolic compounds and antioxidant capacity with respect to mature fava bean seeds. Mature fava bean seeds presented higher bioaccessibility after *in vitro* gastrointestinal simulation. *In silico* analysis predicted the anti-adipogenic effect of flavonoids (EGCG and EC) present in mature and fresh fava bean seeds.

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica, recurrente y progresiva, definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo, la cual puede ser perjudicial para la salud (Aguilera et al., 2019). La prevalencia de esta enfermedad ha ido en aumento tanto a nivel mundial como nacional y con respecto a la población mexicana adulta se ha reportado una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad de un 75.2% en el año 2018 (ENSANUT, 2018).

A través del tiempo se ha mejorado la comprensión de la patogénesis de la obesidad; en los últimos años se ha incrementado el interés por identificar compuestos bioactivos de plantas que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiobesogénicas que permita el avance de las investigaciones en nutrición y enfermedad (Baek et al., 2021).

Las leguminosas son la tercera familia de plantas más grande en todo el mundo. Junto con los cereales han sido la base principal de la alimentación humana, aportando un 4.3% del consumo energético. Debido a esto la FAO y la OMS han establecido que una alimentación saludable comprende el consumo de leguminosas (Sprent et al., 2017; Jordán-Aguilar et al., 2019).

El haba (*Vicia faba* L.) es una leguminosa que se puede encontrar en su forma fresca o madura. En ambos casos, presentan un alto contenido de nutrientes y se les atribuyen múltiples beneficios en la salud. Entre los compuestos bioactivos que presenta el haba, están los flavonoides los cuales se han relacionado con efectos benéficos en el organismo (Turco et al., 2016; Collado et al., 2019). Sin embargo, existe poca información sobre el posible efecto que presenten los flavonoides bioaccesibles de esta leguminosa en el proceso de adipogénesis. Por lo tanto, esta falta de evidencia científica conlleva a realizar esta investigación con la finalidad de identificar los flavonoides bioaccesibles de las semillas de haba maduras y frescas que presenten actividad antiadipogénica mediante un análisis *in silico* que evalúa la energía y sitios de unión con los que interactúan estos compuestos y los factores

de transcripción PPAR γ y C/EBP β , ambos involucrados en el proceso de adipogénesis.

II. ANTECEDENTES

3.1 Obesidad

La prevalencia de la obesidad ha ido en aumento en la última década, a nivel mundial existen alrededor 1.6 billones de adultos con sobrepeso y al menos 600 millones de adultos obesos. México ocupa el segundo lugar en obesidad a nivel mundial y el primer lugar en obesidad infantil (Andersen et al., 2010; Piché et al., 2020). Asimismo, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó que la población mexicana adulta mayor de 20 años, en una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad pasó de ser un 72.6% en 2016 a un 75.2% en 2018 (ENSANUT, 2018).

La obesidad es un trastorno de origen multifactorial, en donde están involucrados diferentes factores como genéticos, sociales, ambientales, culturales y un estilo de vida sedentario (Salem Al-Nbaheen, 2020). Del mismo modo, el aumento del índice de masa corporal es un factor de riesgo determinante para el desarrollo de diversas enfermedades como cardiopatías, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensión, dislipidemias, accidentes cerebrovasculares, entre otras; las cuales pueden agudizarse conforme el grado de obesidad aumenta (Lamiquiz-Moneo et al., 2019). Mantener un índice de masa corporal (IMC) elevado es un factor de riesgo determinante para la aparición de enfermedades no transmisibles (Taylor, 2020). La obesidad está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un IMC igual o superior a 30 (OMS, 2018), debido a que este es un indicador de la relación entre el peso y la talla y es utilizado para identificar el estado nutricional en los adultos. Existen tres clasificaciones de obesidad, las cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Clasificación del índice de masa corporal según la Organización Mundial de la Salud.

Clasificación del IMC	
Obesidad	>30.0
Obesidad de clase I	30.0 – 34.9
Obesidad de clase II	35.0 – 39.9
Obesidad de clase III	>40.0

Fuente: (OMS, 2017)

Esta patología se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud, la cual puede ocurrir a través de diferentes procesos como hipertrofia (aumento del volumen de los adipocitos) o hiperplasia (aumento del número de los adipocitos) (Ruiz-Ojeda et al., 2016).

El tejido adiposo está compuesto de varios tipos de células, como células endoteliales, células sanguíneas, células murales, fibroblastos, preadipocitos, macrófagos y leucocitos; sin embargo, las células que están presentes en mayor cantidad son los adipocitos maduros. Dichos adipocitos son derivados de células madre mesenquimales que poseen la capacidad de diferenciarse (Sarjeant & Stephens, 2012; Walocko et al., 2018).

Además, el tejido adiposo se clasifica en tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón, aunque en los últimos años se encontró que existe un tercer tejido, el tejido adiposo beige (Lima-de-Freitas et al., 2020). El tejido adiposo blanco es el principal sitio de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, así como también presenta una función endocrina debido a que puede secretar diversas hormonas y citocinas. El tejido adiposo marrón se enfoca en el gasto energético en forma de termogénesis. Por último, el tejido adiposo beige está involucrado en la homeostasis del gasto energético y la glucosa (Heras, 2016; Klepac et al., 2019).

En el tejido adiposo ocurre la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, en respuesta al exceso de estrés que se genera cuando existe una alteración en la homeostasis de los lípidos y de la glucosa cuando hay una demanda energética en el organismo, obteniendo una acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo.

Generalmente el primer desorden que ocurre en la obesidad es la disfunción de los adipocitos, ocasionado por una acumulación excesiva de lípidos (Jiang et al., 2019) y debido a que el proceso de adipogénesis se encuentra implicado en la formación de adipocitos es un punto interesante a evaluar; ya que dicho proceso se encuentra regulado por diversos factores de transcripción. Entre los que se encuentran a la proteína de unión del potenciador CCAAT beta (C/EBP β) que se expresa en la etapa temprana de la diferenciación del adipocito e induce al receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ), que se encarga de controlar la diferenciación terminal del adipocito, así como también es necesario para mantener al adipocito diferenciado (Lee et al., 2019). Ambos se encargan de inducir la expresión de genes responsables de diferenciar el preadipocito a adipocito maduro (Aranaz et al., 2019). Por lo tanto, regular este proceso podría ser una excelente medida para prevenir y/o tratar la obesidad (Gan et al., 2017). Para esto, en los últimos años han aumentado investigaciones que utilizan métodos *in silico* para identificar las posibles interacciones entre receptores y ligandos.

3.2 Generalidades de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP β

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) forman parte de una gran familia de receptores de hormonas nucleares que tienen la capacidad de regular genes claves de diferentes procesos metabólicos, los cuales están involucrados en diversas enfermedades como diabetes, cáncer, aterosclerosis, entre otras. Existen tres isoformas de PPAR; PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , mismas que están involucradas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y la homeostasis energética (Janani & Ranjitha, 2015; Mirza et al., 2019).

PPAR γ es expresado en el intestino grueso, el bazo y el tejido adiposo (blanco y marrón), siendo los adipocitos en donde existe mayor expresión, por lo que es de vital importancia su rol en la regulación de la adipogénesis, la biosíntesis de lípidos y el balance energético (figura 1). Existen dos isoformas de PPAR γ ; PPAR γ 1 y PPAR γ 2. PPAR γ 1 se expresa mayormente en tejido adiposo, intestino grueso y

células hematopoyéticas y una menor expresión en riñón, hígado, músculos, páncreas e intestino delgado. PPAR γ 2 se encuentra principalmente expresado en tejido adiposo blanco y marrón y está relacionada con la ingesta de nutrientes y la obesidad (Feng et al., 2021; Sauer, 2015; Wang et al., 2014).

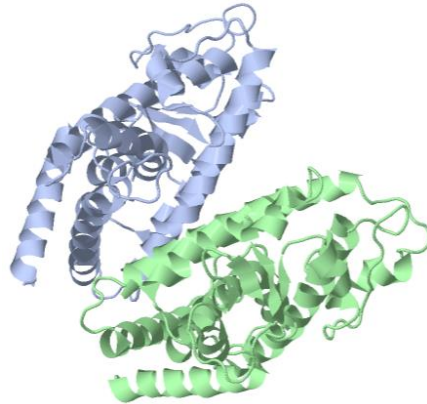


Figura 1 Estructura de la isoforma PPAR γ , cadena A y B (*Berman et al., 2000*).

PPAR γ es el principal regulador de la diferenciación de adipocitos, asimismo regula genes que participan en el metabolismo lipídico, como la lipoproteína lipasa, transportador de ácidos grasos CD36. Por lo tanto, protege al organismo de un exceso de lípidos y es capaz de regular la secreción de adipocitocinas como la adiponectina, la leptina, resistina y el factor de necrosis tumoral α , que son mediadas por el tejido adiposo (Janani & Ranjitha, 2015; Wang et al., 2014). Sin embargo, es necesaria la presencia otros factores de transcripción (C/EBP β y C/EBP δ) para regular la expresión de PPAR γ en el proceso de la adipogénesis (figura 2) (Xue et al., 2020).

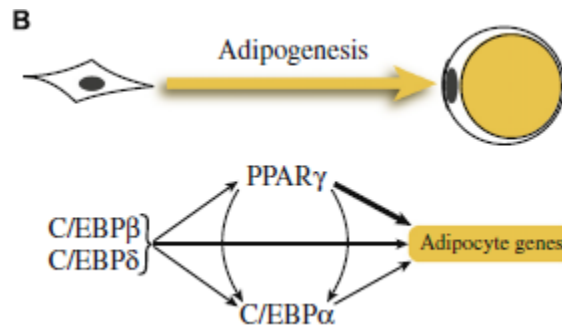


Figura 2 Participación de los receptores C/EBP α , β , δ y PPAR γ en el proceso de adipogénesis (Siersbæk et al., 2010).

Los miembros de la familia de factores de transcripción CCAAT/proteína de unión a potenciador (C/EBP) también se encuentran involucrados en la diferenciación de los adipocitos. Está compuesta por seis proteínas (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP γ , C/EBP ϵ y C/EBP ζ), pero las isoformas que más se han estudiado son la C/EBP α y la C/EBP β , mismas que se expresan principalmente en el tejido hepático, adiposo y pulmonar. También es conocido que C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ son clave en el proceso de adipogénesis (Nerlov, 2007; Siersbæk et al., 2010).

C/EBP β se considera como un factor crucial en la etapa temprana de adipogénesis, debido a que es el encargado de inducir la activación y expresión de C/EBP α y PPAR γ los cuales son necesarios para llevar a cabo el proceso de adipogénesis, por lo tanto, se considera que este factor es el que lleva a cabo la diferenciación de los adipocitos maduros (figura 3) (Guo et al., 2015).

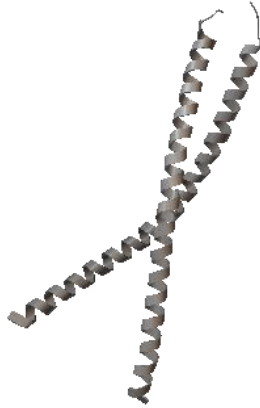


Figura 3 Estructura de la isoforma C/EBP β , cadena A y B (Berman et al., 2000).

En modelos *in vitro* se ha observado que cuando se añaden tratamientos adipogénicos como isobutilmetilxantina (IBMX), dexametasona (DEX) e insulina a cultivos celulares son capaces de estimular la inducción de C/EBP β y mantener niveles altos del mismo para que se lleve a cabo la diferenciación celular, por otro lado, se ha identificado en preadipocitos 3T3-L1 que cuando este factor de transcripción es eliminado bloquea el proceso de adipogénesis. Incluso en modelos *in vivo* se ha demostrado que cuando existe una alteración en el gen de C/EBP β , ocasiona un desarrollo deficiente del tejido adiposo y por lo tanto, se observa una disminución de la masa grasa (Guo et al., 2015; Lee et al., 2020).

3.2 Tratamientos alternativos

La OMS estimó que en el mundo el 80% de las personas utilizan tratamientos alternativos a base de productos naturales, las cuales incluyen a los extractos de plantas que tienen compuestos bioactivos, con el fin de mejorar su salud. Los productos naturales tienen diversas funciones por las cuales se pueden clasificar dependiendo de su efecto, entre ellos los que son utilizados para inhibir la absorción de nutrientes, disminuir la adipogénesis, suprimir el apetito y/o modificar la microbiota intestinal. Debido a esto, incluir en la dieta fuentes vegetales que poseen alto contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes, puede ser una alternativa

adecuada para mejorar las enfermedades crónico-degenerativas que existen en la población, entre ellas la obesidad (Arulselvan et al., 2016; Fu et al., 2016).

3.4 Importancia de las leguminosas

Las leguminosas forman parte de la familia *Fabacea* o *Leguminosae*, tienen origen desde hace millones de años, incluso pueden llegar a ser más antiguas que el maíz (FAO, 2016). Es la tercera familia de plantas más grande del mundo, están conformadas por una amplia familia de más de 450 géneros y 12,000 especies. Se caracterizan porque su fruto está dentro de una vaina, dicho fruto es abundante en nutrientes, lo cual es una de las principales razones por las que son ampliamente cultivadas. Asimismo, se ha observado que aunque las semillas sean almacenadas durante varios meses, su valor nutricional no se ve afectado (Foschia et al., 2017; Sprent et al., 2017; FAO, 2016).

A nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en producción de leguminosas, dentro de las que son mayormente cultivadas se encuentra el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el chícharo (*Pisum sativum* L.), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y el haba (*Vicia faba* L.) (Javaloyes et al., 2016). Principalmente son utilizadas para la nutrición humana y la nutrición animal (Rebaa et al., 2017). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS establecen que una dieta saludable debe estar integrada por frutas y verduras, leguminosas, cereales y nueces. En México en el año 2013 se registró un consumo total de 12.39 kg/persona/año y a nivel mundial se consume un promedio de 7.21 kg/persona/año. Por lo que se hace mucho énfasis en aumentar el consumo de leguminosas y disminuir el consumo de carnes, ayudando así a disminuir los niveles de colesterol en sangre (Collado et al., 2019; "FAOSTAT," 2013; Jordán-Aguilar et al., 2019). Dichas semillas poseen alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibra dietética, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, los cuales tiene efectos benéficos en el organismo, por lo que son una buena fuente alimenticia para el ser humano (Foschia et al., 2017). Se consideran esenciales en la alimentación humana, aportando un 4.3% del consumo energético. A pesar de estos datos, su consumo

es bajo debido a que no existen productos alimenticios a base de leguminosas que sean atractivos para el consumidor y estén adaptados a la vida moderna (Jordán-Aguilar et al., 2019). Estudios recientes informan que cuando son consumidas como parte de la dieta diaria puede ocasionar una reducción de los de colesterol LDL, así como disminuir el riesgo de presentar diversos tipos de cáncer como de próstata y de mama y un menor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares y diabetes (Chen et al., 2015).

3.5 Generalidades del haba (*Vicia faba* L.)

El haba es una leguminosa consumida en todo el mundo, su nombre científico es *Vicia faba* L., es un cultivo que pertenece a la familia de *Fabaceae* (*Leguminosae*) (Prabhu & Rajeswari, 2018). En el mundo existe un gran número de variedades diferentes; por lo que también se le conoce como habones, fabera, haba caballar y haba de Windsor. Esta planta tiene su origen en el Medio Oriente, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado su cultivo en el hemisferio norte, incluido México. Debido a esto, se tiene el conocimiento de que puede ser cultivada en diferentes condiciones climáticas, así como en diferentes tipos de suelo. (Etemadi et al., 2019; FAO, 2016).

3.5.1 Características del cultivo

3.5.1.1 Características biológicas

La planta de haba (*Vicia faba* L.) se caracteriza por ser recta, posee una raíz muy desarrollada, puede alcanzar entre los 90 y 130 cm de altura, en promedio crece un nodo por semana y las flores generalmente se encuentran en racimos pequeños (figura 4). El color característico de la semilla es un tono verde-amarillento cuando aún están verdes, una vez que la semilla se seca adquiere un color amarillo (SADER, 2015). Los frutos de la planta presentan diversos tamaños, incluso las vainas pueden llegar a medir 35 centímetros de longitud y de 1 a 3 cm de ancho. En la mayoría de las veces contienen alrededor de dos a nueve granos de haba. En condiciones normales, las semillas de haba llegan a su crecimiento entre los 10 y

14 días (Etemadi et al., 2019). La longitud de las semillas puede ser de 0.5 a 3 cm y el ancho puede variar de 0.5 a 2 cm, además, pueden almacenarse por periodos largos sin que esto afecte su composición nutricional. Asimismo, la producción de estas leguminosas mejora la calidad de la tierra donde son cultivadas, porque posee una función de fijación de nitrógeno, lo que favorece a la agricultura (Araujo, 2019).

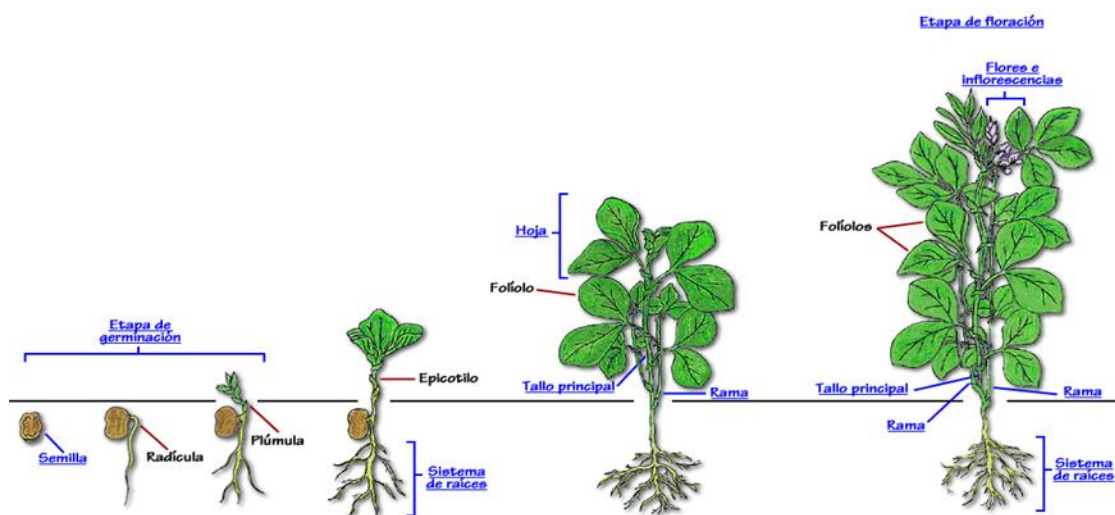


Figura 4 Crecimiento y desarrollo de la planta de haba (*Vicia faba* L.). Adaptado de http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/haba.htm

3.5.1.2 Producción del cultivo

En la tabla 2 se muestran algunas áreas y la producción de toneladas de haba que se tuvo durante el año 2018, donde se puede observar que México ocupa el decimocuarto lugar en producción.

A nivel nacional se tiene una producción superior a las 36 mil toneladas siendo el estado de México el mayor productor. Asimismo, la producción de haba es de gran importancia económica en las entidades denominadas Valles Altos, que incluye los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Hidalgo, Guanajuato, Morelos, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (Jordán-Aguilar et al., 2019, Morales, 2002).

Tabla 2 Áreas y total de producción.

#	Área	Producción (toneladas)
1	China	1806010
2	Etiopía	988262
3	Reino unido	402000
4	Australia	377740
5	Alemania	160800
6	Marruecos	148745
7	Francia	147254
8	Egipto	139303
9	Italia	101625
10	Sudán	100617
11	Perú	78380
12	República Tunecina	61955
13	España	54878
14	México	37047

Fuente: (FAOSTAT, 2018)

3.5.2 Características nutricionales del haba

El haba es una importante fuente de proteínas, carbohidratos complejos, fibra dietética, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos; son bajas en grasa y en sodio, por lo que es de gran importancia para la nutrición humana; aunque también contienen factores antinutrimientales como saponinas, alcaloides del ácido fítico y taninos (Turco et al., 2016). En la tabla 3 se muestran las características nutricionales del haba madura y haba fresca, donde se puede observar que el haba madura posee un mayor valor nutricional.

En México, el haba es un ingrediente altamente utilizado en la cocina; existen diferentes formas de uso culinario y, por lo tanto, una gran variedad de platillos para el consumo humano (Göl et al., 2017; Kumar et al., 2015). Del mismo modo, desde años atrás ha sido un alimento utilizado en diversas enfermedades como diabetes, parkinson, dislipidemias, debido a sus propiedades terapéuticas (Duan et al., 2021; Prabhu & Rajeswari, 2018). Estudios han reportado que su consumo tiene efectos antihiperlipidémicos e hipocolesterolémicos. Asimismo, debido a los compuestos fenólicos que posee, tiene la capacidad de inhibir algunas enzimas como la lipasa,

enzima encargada de hidrolizar los triglicéridos, reduciendo así la incidencia de desarrollar enfermedades cardiovasculares en modelos *in vivo* (Allam et al., 2018; Siah et al., 2014). En la actualidad ha incrementado su interés científico debido a que puede ser utilizada para el desarrollo de alimentos funcionales. Existe evidencia relevante respecto al alto contenido de compuestos fenólicos que posee el haba, principalmente los flavonoides, los cuales actúan como antioxidantes, y se les atribuyen efectos benéficos a la salud, por lo que proponen usar esta leguminosa como coadyuvante en diversas enfermedades (Collado et al., 2019; Kumar et al., 2015; Vioque et al., 2012). En la tabla 3 se presenta la composición de nutrimentos del haba en dos diferentes estados, madura y fresca.

Tabla 3 Composición nutricional del haba (*Vicia faba* L.) madura y fresca en 100 gramos.

Parámetros	Haba	
	Madura	Fresca
Energía (kcal)	372.00	65.00
Proteína (g)	23.00	4.60
Grasa (g)	2.00	0.40
Hidratos de carbono (g)	56.00	8.60
Fibra (g)	19.00	4.20
Potasio (mg)	1030.00	323.00
Hierro (mg)	8.50	1.70
Calcio (mg)	115.00	23.00
Fosforo (mg)	590.00	84.00
Magnesio (mg)	140.00	28.00
Zinc (mg)	3.50	0.70
Sodio (mg)	3.50	120.00
Selenio (µg)	8.20	5.40
Vitamina B1 (mg)	0.52	0.17
Niacina (mg)	4.90	2.80
Folatos (mg)	140.00	78.00

Adaptado de (Enjamio et al., 2017).

3.5.2.1 Compuestos fenólicos presentes en las semillas de haba

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes de forma natural en las plantas, poseen en su estructura uno o más anillos aromáticos con grupos hidroxilo. Pueden clasificarse en diferentes grupos dependiendo del número de anillos y de los elementos unidos que presenten (Turco et al., 2016). Algunas clasificaciones son: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos, taninos, entre otros. Contribuyen a la morfología, crecimiento y reproducción de la planta. Se encargan de dar el color y sabor a los alimentos y están involucrados en los mecanismos de defensa frente a agentes externos, entre ellos patógenos y/o rayos UV (Khalid et al., 2019).

La cantidad y tipo de compuestos fenólicos que se pueden encontrar dependerá de cada alimento. Las leguminosas poseen una importante cantidad de estos compuestos, por lo que, se consideran como una buena opción para elaborar nuevos alimentos funcionales (Amarowicz & Shahidi, 2017; Singh et al., 2017). Estos compuestos están distribuidos en todas las partes de la planta como hojas, raíces, semillas y fruto. Específicamente, el haba es una fuente de diversos compuestos fenólicos que poseen propiedades antioxidantes, igualando en cantidad a los que se han encontrado en los chocolates y en el cacao (Turco et al., 2016). Por ejemplo Vioque et al., (2012) realizó una comparación entre haba madura, garbanzo y chícharo respecto al contenido de polifenoles y observó que el haba presentan el doble de contenido de polifenoles que las otras leguminosas y por lo tanto, pueden poseer una actividad antioxidante mayor comparado con el garbanzo y el chícharo (Tabla 4).

Tabla 4 Contenido de polifenoles en extracto de polifenoles de haba (*Vicia faba* L.), garbanzo (*Cicer arietinum*) y chícharo (*Pisum sativum*).

Leguminosas	Polifenoles (% p/p)
Haba (<i>Vicia faba</i>)	0.15 ± 0.001
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	0.07 ± 0.002
Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	0.05 ± 0.001

Fuente: (Vioque et al., 2012)

En la actualidad Abu-Reidah et al., (2017), han identificado alrededor de 134 compuestos fenólicos presentes en el haba fresca, de los cuales los flavonoides son el grupo más extenso de compuestos fenólicos. Estos compuestos son de sumo interés nutricional, debido a que promueven un buen estado de salud, presentando efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, entre otros (Singh et al., 2017).

Sin embargo, la manera en que los compuestos son metabolizados afecta la funcionalidad de los mismos, por lo que son necesarios los estudios que evalúen la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos para tener una visión más clara de las propiedades funcionales que pueda tener este alimento una vez que es consumido (Luzardo-Ocampo et al., 2017). Un aspecto importante es que el metabolismo que involucra la conjugación de fase II de los compuestos fenólicos, es la causa principal de que presenten baja biodisponibilidad (Hu et al., 2017).

3.5.2.2 Flavonoides presentes en las semillas de habas

Los flavonoides son de los compuestos fenólicos más abundantes, se han llegado a identificar más de 5,000 flavonoides diferentes. Su estructura está compuesta por dos anillos de benceno (A y B), unidos por un anillo heterocíclico (C) como se muestra en la figura 5 (Maleki et al., 2019). Pueden clasificarse en diferentes subclases como: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y flavanoles o flavan-3-oles. (Wang et al., 2018).

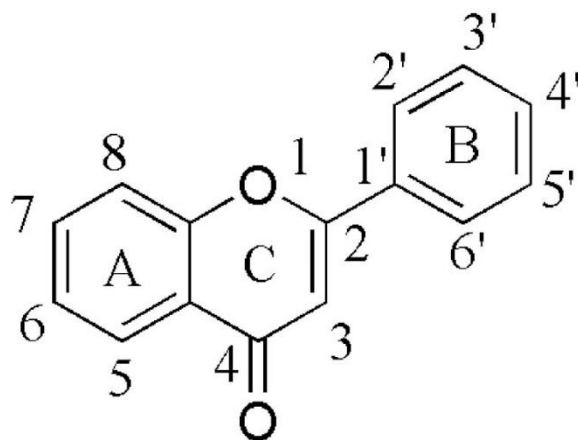


Figura 5 Estructura de los flavonoides (Wang et al., 2018).

Los flavonoides son los principales compuestos fenólicos que se han encontrado en el haba; se han identificado diferentes grupos como los flavanoles, proantocianidinas, flavonoles y flavanones (Turco et al., 2016). En la tabla 5 se muestra el contenido de diferentes clases de flavonoides encontrados en semillas de haba maduras y frescas, obtenidos de la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y de Phenol-Explorer (Neveu et al., 2010; Bhagwat et al., 2014).

Tabla 5 Contenido de flavonoides en habas, semillas frescas y maduras (mg/100g).

Flavonoides	Clase	Semillas frescas, crudas	Semillas maduras, crudas
Flavan-3-ols	(-)-Epicatequina	28.96	22.51
	(-)-Epigallocatequina	15.47	14.03
	(+)-Catequina	14.29	12.83
	(+)-Galocatequina	4.15	4.84
Flavonoles	Miricetina	2.60	2.60
	Quercetina	2.00	2.00

Fuente: (Bhagwat et al., 2014; Neveu et al., 2010).

Estos compuestos tienen un papel de alta importancia en las funciones bioquímicas y fisiológicas de la planta, ya que están involucrados en el crecimiento y en la actividad enzimática de la planta (Chaieb et al., 2015). De igual manera son de sumo interés y han sido cada vez más estudiados porque se ha encontrado que presentan

efectos benéficos en la salud, dadas sus propiedades antioxidantes que se encargan de eliminar los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, dando como resultado que exista una inhibición de los mecanismos oxidativos que ocasionan las enfermedades. Debido a esto, se les atribuyen efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antihipertensivos, antivirales, antiobesidad y anticancerígenos, entre otros (Allam et al., 2018; Chen et al., 2015; Guzmán-Ortiz et al., 2017; Kumkarnjana et al., 2018). De igual manera, existe evidencia científica que sugiere que modulan cascadas de señalización intracelulares donde intervienen factores de transcripción como PPAR γ y C/EBP β (Andersen et al., 2010; Marathe et al., 2011)

3.5.2.3 Bioaccesibilidad de los flavonoides

Los efectos de los compuestos bioactivos van a depender del grado de absorción y de la forma en que son metabolizados, aunque los flavonoides se puedan encontrar en gran variedad de plantas y a su vez poseen diversos efectos benéficos en la salud, la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad suele ser baja, por lo que, es un tema de alta importancia que cada vez es más estudiado, ya que esta información permite comprobar las propiedades saludables de los alimentos funcionales. (Luzardo-Ocampo et al., 2017; Wang et al., 2018). Cilla et al., (2018) define la biodisponibilidad como la fracción del componente ingerido disponible para su utilización en funciones fisiológicas normales, sin embargo, para llegar a esto, tiene que conocerse en primera instancia la bioaccesibilidad, la cual definen como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, está disponible para la absorción intestinal, para posteriormente determinar la calidad nutricional del compuesto bioactivo. Debido a esto, se tienen de tomar en cuenta diversos factores que pueden influir en estos dos aspectos, como lo son el medio ambiente, el proceso de los alimentos, la presencia de otros nutrientes, el pH, la temperatura, la actividad enzimática y la estructura química (Cilla et al., 2018).

Los flavonoides provenientes de la dieta se encuentran principalmente en forma conjugada unidos a azúcares por medio de los grupos fenólicos o el grupo hidroxilo

de la posición C-3, C-5 o C-7 por ello también se les conoce como glucósidos. Sin embargo, se ha reportado que las estructuras químicas complejas y de mayor peso molecular como los glucósidos, afecta la bioaccesibilidad del compuesto. Por otro lado, se ha comprobado que los flavonoides en su forma aglicona pueden ser absorbidos directamente por el intestino. En el caso de los glucósidos, para que puedan llegar al intestino es necesaria la presencia de diversos transportadores como los transportadores de glucosa dependiente de sodio (SGLT1), transportador de monocarboxilato (MCT) (Gómez, 2015; Peña, 2019). En el intestino delgado se encuentran presentes diversas enzimas, como: lactasa florina hidrolasa (LPH), β -glucosidasa y piridoxina glucósido hidrolasa, que están involucrados en el metabolismo de los flavonoides. De las cuales LPH se encuentra en el borde epitelial del intestino delgado y es la que se encarga de actuar sobre el enlace glucosídico de los glucósidos antes de que sean absorbidos para obtener las agliconas (Cassidy & Minihane, 2017; Day et al., 2000; Murota et al., 2018). Los compuestos que no se absorbieron en el intestino delgado pasan al colon, en donde ocurre la hidrólisis de los glucósidos, proceso que esta mediado por la microbiota que realiza modificaciones químicas, produciendo moléculas más pequeñas que pueden ser absorbidas con mayor facilidad (Hollman et al., 1999; Williamson & Clifford, 2017). El metabolismo de los flavonoides sigue las mismas vías metabólicas que los xenobióticos, por lo que, una vez que fueron absorbidos son sometidos al metabolismo de fase II para su biotransformación, donde están involucradas las enzimas catecol-O-metil transferasa (COMT), sulfotransferasas (SULT) y UDP-glucoronosiltransferasas (UGT). Posteriormente los productos obtenidos pasan a través de la vena porta hacia el hígado y poder ingresar a la circulación hasta que son excretados por vía renal (Marín et al., 2015) (Figura 6).

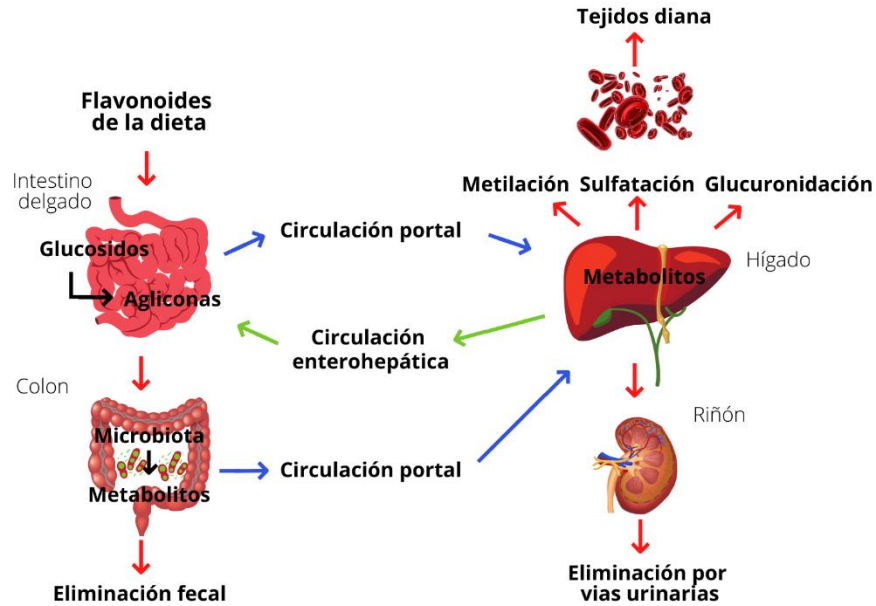


Figura 6 Metabolismo de los flavonoides. Modificada de Cassidy & Minihane, 2017; Marín et al., 2015.

Para evaluar la actividad biológica de diversos compuestos fenólicos que están presentes en diferentes matrices alimentarias, se ha utilizado ampliamente los métodos de digestión *in vitro* con el fin de simular la digestión gastrointestinal, ya que estos métodos se caracterizan por ser rápidos y seguros (Kamiloglu & Capanoglu, 2014). Sin embargo, las investigaciones sobre el efecto que presenta la digestión gastrointestinal en los flavonoides y capacidad antioxidante de las semillas de haba son escasos.

3.6 Modelos *in silico*

El nombre de los modelos *in silico* hacen referencia a la estructura interna de una computadora, debido a que está compuesta en su mayoría de silicio. Este modelo se implementó como una alternativa para realizar simulaciones de investigación a nivel computacional. Existen diferentes formas en que utiliza las plataformas y las bases de datos para conocer las interacciones que existen entre diferentes proteínas y compuestos fenólicos y la relación estructura-función (Scior et al., 2007; Bandyopadhyay et al., 2014).

Para realizar el método *in silico* se utiliza un paquete de software MGL Tools, desarrollado en el laboratorio Sanner del Centro de Biología Estructural Computacional. El software comprende Python Molecular Viewer (visor molecular), AutodockTools (conjunto de comandos) y Vision (entorno de programación visual) (Morris et al., 2009). Autodock es un conjunto de herramientas de acoplamiento molecular no comercial más popular y utilizado, permite predecir el sitio en que una macromolécula (receptor) se une con una molécula pequeña (ligando). Tiene como objetivo calcular su energía de unión, que nos indica cuales son compuestos son más afines al receptor y posibles responsables de la modulación de su actividad (Mohd et al., 2013; Sulimov et al., 2019). A su vez se utiliza la plataforma Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), constituido en 1971 en el Laboratorio Nacional de Brookhaven por Walter Hamilton, siendo el primer recurso de datos digitales de acceso gratuito. Proporciona información sobre las estructuras de proteínas, ácidos nucleicos y ensamblajes complejos (macromoléculas biológicas) en 3D como PPAR γ y C/EBP β (Berman et al., 2000).

Con respecto a los ligandos, se utiliza otro programa llamado Avogadro (<https://avogadro.cc/>), el cual es una herramienta que permite editar y visualizar moléculas en 3D de forma gratuita y de código abierto, que pueden ser usadas en diversas plataformas como química computacional, modelado molecular, bioinformática, ciencia de materiales y otras áreas relacionadas (Hanwell et al., 2012). Este programa permite la visualización y la transformación a formato MOL2 de las estructuras de los flavonoides en 3D, obtenidas previamente de la base de datos PubChem de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) creada en el 2004. Es un recurso informático que contiene en su mayoría moléculas pequeñas, proporciona información sobre estructuras químicas, propiedades químicas y físicas, actividades biológicas, datos de seguridad y toxicidad (Wang et al., 2009).

3.7 Efecto de los flavonoides sobre PPAR γ y C/EBP β

En los últimos años ha incrementado la evidencia científica que respalda el uso de los productos naturales, debido a que pueden llegar a inhibir el proceso de adipogénesis, y, por otra parte, estimular la lipólisis en los adipocitos, por lo que son de gran importancia, ya que pueden ser candidatos para prevenir y/o aminorar la gravedad de ciertas enfermedades como la obesidad (Andersen et al., 2010). En este sentido, han surgido una diversidad de moléculas que pueden actuar como ligandos de PPAR γ : ácidos grasos poliinsaturados, prostanoides, eicosanoides, componentes de lipoproteínas oxidadas de baja densidad y compuestos fenólicos (Encinar et al., 2015; Damian-Medina et al., 2020).

El uso de herramientas bioinformáticas actuales como diferentes programas, entre ellos Autodock, PyRx, Avogadro, UCSF Chimera y diferentes bases de datos como PubChem y Phenol-Explorer, han aumentado en la última década enriqueciendo mucho la información para detectar y predecir las posibles uniones entre receptor-ligando (Encinar et al., 2015; Reddy et al., 2020). Asimismo, se han demostrado que los compuestos fenólicos, específicamente los flavonoides provenientes de vegetales tienen efectos beneficiosos sobre los procesos metabólicos en modelos *in vitro*, siendo capaz de inhibir la adipogénesis, efecto que se les atribuye por su alta actividad antioxidante (Castillo et al., 2019; Herranz-López et al., 2012).

PPAR γ es una proteína ampliamente utilizada para explorar la capacidad de modulación que tienen los compuestos bioactivos sobre la activación de esta proteína. Dichos compuestos interactúan con el dominio de unión al ligando de PPAR γ y se han identificado que la unión de ligandos a los residuos de aminoácidos del receptor Phe264, His266, Ile281, Cys285, Arg288, Ser289, Met348 e His449 produce efectos antiadipogénicos (Aranaz et al., 2019; Damián-Medina et al., 2020; Prabhu & Rajeswari, 2020; Puhl et al., 2012; Mohan et al., 2020). En relación a C/EBP β , es una proteína que se ha estudiado muy poco en relación al proceso de adipogénesis mediante los análisis *in silico*, pero si se ha logrado identificar la unión de ligandos con el receptor, ocurriendo en un extremo de la proteína, en el residuo del aminoácido Glu336 (Pulugulla et al., 2018). Por otra parte, se ha evaluado C/EBP β en conjunto con el factor nuclear kappa B (NF- κ B), debido a que interactúan

entre sí, además los sitios de unión de ambas se pueden combinar y regular diversos genes (Naamane et al., 2007). Asimismo, Rui et al., (2013) identificaron que GATA-2 puede unirse a la región promotora de C/EBP β , ocasionando la inhibición de su desmetilación y, por lo tanto, que la expresión de la proteína se vea disminuida. Debido a su importancia en diversos procesos fisiológicos y a la gran relevancia que presenta en el proceso de adipogénesis es necesario generar información utilizando herramientas informáticas. Mediante estas plataformas se puede predecir el potencial antiadipogénico que poseen los flavonoides presentes en las semillas de haba maduras y frescas al unirse a los receptores PPAR γ y C/EBP β , los cuales son clave en el proceso de adipogénesis.

Por otro lado, se ha observado que el extracto compuesto de fenólicos del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) actúan directamente en los adipocitos induciendo la lipólisis en un modelo *in vitro* (Castillo et al., 2019; Chen et al., 2015). Del mismo modo, la miricetina; un flavonol encontrado en vegetales, inhibe la diferenciación de los preadipocitos y disminuye la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1, mediante la reducción de la expresión de factores de transcripción y de ciertos genes involucrados en el metabolismo lipídico, como C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , lipoproteína lipasa (LPL), proteína transportadora de ácidos grasos 4 (aP2) y el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Wang et al., 2015). De igual importancia el extracto de isoflavonas del germinado de semillas de garbanzos (*Cicer arietinum*), es capaz de suprimir la adipogénesis y disminuir la acumulación lipídica en un modelo *in vitro* y estimular la captación de glucosa, atenuando tanto el ARNm como la proteína de C/EBP α , PPAR γ , aP2, LPL, proteína desacoplante 2 (UCP-2) y GLUT 4 (Gao et al., 2015). Sin embargo, existe escasez de información relacionada con los flavonoides presentes en las semillas de haba maduras y frescas y su posible actividad antiadipogénica.

III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad aqueja a un 13% de la población adulta a nivel mundial y a un 36% de la población mayor de veinte años a nivel nacional (ENSANUT, 2018; OMS, 2020), ocasionando el desarrollo de diversas comorbilidades. Hasta la fecha estos valores van en incremento, por lo que es necesario identificar compuestos bioactivos con potencial antiadipogénico mediante análisis *in silico* como una primera etapa en el desarrollo de alimentos funcionales novedosos y de fácil acceso, que pueda ser utilizado para prevenir la obesidad.

Por otro lado, las semillas de haba en su etapa madura y fresca son una fuente económica de alto valor nutricional, que contiene diferentes compuestos bioactivos como los flavonoides que poseen efectos benéficos en la salud, principalmente contra la obesidad, por su actividad antiinflamatoria y antiobesogénica. Sin embargo, es necesario que exista más claridad respecto a los compuestos bioactivos presentes en semillas de haba madura y fresca y los efectos de la fracción bioaccesible específicamente de los flavonoides del haba en sus dos etapas, sobre la adipogénesis.

Por lo tanto, esta investigación generará conocimientos sobre el efecto antiadipogénico *in silico* de la fracción bioaccesible de los flavonoides presentes en semillas de haba maduras y frescas sobre los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP β , los cuales son importantes reguladores de la adipogénesis. Esto con el fin de ser utilizados en estudios y etapas posteriores para el desarrollo de un nuevo alimento funcional que pueda disminuir la prevalencia de la enfermedad y promover el consumo de esta leguminosa.

IV. HIPÓTESIS

Los flavonoides bioaccesibles de las semillas maduras y frescas de haba (*Vicia faba* L.) tienen efecto antiadipogénico *in silico*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiadipogénico *in silico* de los flavonoides bioaccesibles de las semillas maduras y frescas de haba (*Vicia faba* L.).

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de las semillas maduras y frescas de haba (*Vicia faba* L.) mediante un modelo de digestión *in vitro*.
2. Identificar y cuantificar los flavonoides bioaccesibles de las semillas maduras y frescas de haba (*Vicia faba* L.) a través de un modelo de digestión *in vitro*.
3. Analizar la energía de unión ligando-receptor *in silico* de los flavonoides bioaccesibles de semillas maduras y frescas de haba y los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP β .

VI. METODOLOGÍA

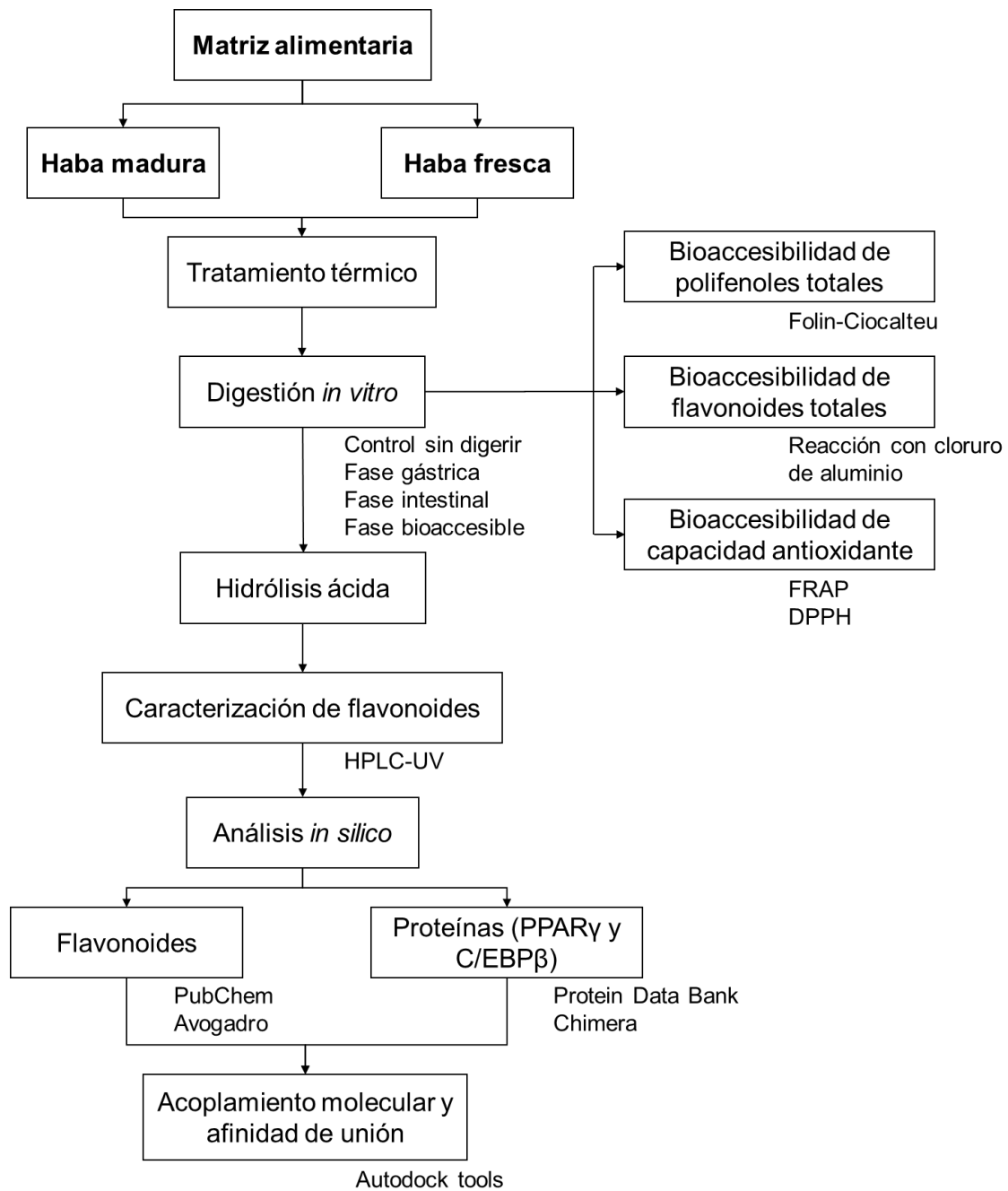


Figura 7 Esquema general de la investigación.

6.3 Procedimiento

6.3.1 Preparación de la muestra

Para el análisis de las semillas de habas provenientes de la cosecha del 2018 de la región agrícola del estado de Puebla, muestras de 1000 g se seleccionaron para eliminar impurezas, semillas rotas y enfermas, posteriormente se sometieron a un tratamiento térmico en el horno Felisa FE 292D a 70°C durante 24 horas, después fueron molidas utilizando IKA A11 basic S1 y luego se tamizaron utilizando un tamiz de 420 µm de abertura, finalmente se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

6.3.2. Extracción de la fracción de flavonoides de las semillas de haba

La extracción de flavonoides se realizó de acuerdo con el método de Jiménez-Escrig et al., (2001) con ligeras modificaciones. Se añadieron 200 mL de acetona/agua (70:30 v/v) a 20 g de harina de haba previamente pesada en frascos de vidrio cubiertos con aluminio, los frascos se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Los frascos se filtraron usando una fibra de vidrio y se recuperó el sobrenadante. Luego se añadió al residuo 200 mL de metanol/agua (50:50 v/v) más HCl para obtener un pH de 2.0 y se repitió el proceso de agitación y filtración. Al final se combinaron los extractos y se liofilizaron. El procedimiento de extracción se realizó en dos lotes independientes por triplicado.

6.3.3 Digestión *in vitro*

La digestión gastrointestinal simulada se realizó de acuerdo con el método de Brodkorb et al., (2019). El proceso implicó tres fases, la fase oral, que simula las condiciones de la boca, la fase gástrica, que imito las condiciones del estómago, seguido de la digestión con sales biliares y pancreatina, que simulo el proceso de digestión intestinal.

Para la fase oral, se colocaron 5 g de harina 4 mL de fluido similar a saliva (FSS), 0.025 mL CaCl₂ 0.3 M y 0.975 mL de H₂O, los tubos se incubaron a 37 °C en un baño con agua durante 120 minutos con agitación y en oscuridad. Para la fase

gástrica se añadieron 8 mL de fluido similar a fase gástrica (FSG), 0.005 mL de CaCl₂ 0.3 M, 0.895 mL de H₂O, 1.6 mL de pepsina y se ajustó el pH a 3.0 con HCl 1 M, los tubos se incubaron a 37 °C en un baño con agua durante 120 minutos con agitación y en oscuridad. Para la fase intestinal se añadieron 8.5 mL de fluido similar a fase intestinal (FSI), 0.040 mL de CaCl₂ 0.3 M, 3.76 mL de H₂O, 5 mL de pancreatina, 2.5 mL de bilis y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 M, los tubos se incubaron a 37 °C en un baño con agua durante 120 minutos con agitación y en oscuridad.

La bioaccesibilidad se realizó por el método Yu et al., (2019). Las mezclas de la fase intestinal se transfirieron a membranas de diálisis de 17 cm de largo y se colocaron en matraces Erlenmeyer que contenían 200 mL de buffer fosfato salino (PBS), se incubaron durante 120 min a 37 °C en agitación y oscuridad. La fracción que estaba fuera de la membrana se consideró como la fracción absorbible y la fracción que estaba dentro de la membrana se consideró como la fracción no absorbible que puede llegar al colon y ser metabolizada nuevamente. Al finalizar ambas fracciones se transfirieron a tubos Falcon. Todas las fases se centrifugaron (Centrifuga Hermle Z326K) a 4000 g durante 20 min, los residuos se desecharon y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C. El procedimiento de digestión *in vitro* se realizó en dos lotes independientes por triplicado.

El porcentaje de bioaccesibilidad fue determinado como:

$$\%B = (FB/FI) * 100$$

Dónde: %B es el porcentaje de bioaccesibilidad, FB es el contenido total obtenido en la fase bioaccesible (mg) y FI es el contenido total obtenido en la fase intestinal (mg) (Peña, 2019).

6.3.4 Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el análisis colorimétrico utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Leos-Rivas et al., (2016). En un vial se agregaron 0.1 mL de muestra y 0.250 mL de reactivo de Folic-

Coicalteau 1 N. Después se añadió 1,25 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20% a cada vial, se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada. Después de 120 min en condiciones de obscuridad, se midió la absorbancia (760 nm) mediante un espectrofotómetro thermo scientific evolution 300LC. La medición se comparó con una curva de calibración de ácido gálico y los resultados se expresaron como miligramo de equivalentes de ácido gálico por gramo de harina de haba (mg EAG/g muestra).

6.3.5 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides totales de las muestras se determinó usando el método descrito por Hithamani & Srinivasan, (2014) con ligeras modificaciones. 0.1 mL de muestra se mezcló con 0.4 mL de agua destilada, después se añadieron 0.03 mL de solución de nitrito de sodio al 5%. Después de 5 min, se agregaron 0.03 mL de cloruro de aluminio hexahidratado al 10%. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar durante 5 min. Luego se agregaron 0.2 mL de NaOH 1 M, se ajustó el volumen a 1 mL y se dejó reaccionar durante 15 min. La absorbancia se midió a 540 nm usando un espectrofotómetro thermo scientific evolution 300LC. La medición se comparó con una curva de calibración de catequina y los resultados se expresaron como miligramo de equivalentes de catequina por gramo de harina de haba (mg EC/g muestra).

6.3.6 Determinación de capacidad antioxidante

6.3.6.1 FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

La determinación de capacidad antioxidante por el método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) se realizó por el método descrito por Benzie & Strain, (1996). En un vial se añadieron 0.03 mL de muestra, seguido de 0.09 mL de agua destilada y finalmente 0.9 mL del reactivo FRAP. Se incubó durante 30 min a 37 °C en obscuridad. La absorbancia se midió a 593 nm. La medición se comparó con una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes de trolox por gramo de harina de haba (μM E Trolox/g muestra).

6.3.6.2 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

La determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), se realizó por el método descrito por Bondet et al., (1997). En un vial se añadieron 0.025 mL de muestra, seguido de 0.975 mL del reactivo DPPH. Se incubó durante 60 min en obscuridad. La absorbancia fue leída a 515 nm. La medición se comparó con una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes de trolox por gramo de harina de haba ($\mu\text{M E Trolox/g muestra}$).

6.3.7 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles

La fase gástrica, intestinal y bioaccesible de las muestras de haba madura y haba fresca después de la digestión *in vitro* fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) posterior a una hidrólisis.

Previo a su análisis por HPLC se realizó una hidrólisis ácida a las fases resultantes de la digestión *in vitro*, siguiendo la metodología de Kostikova & Veklich, (2020) con ligeras modificaciones. Para analizar las agliconas libres correspondientes a los glucósidos, se añadió 1 mL de HCl 2 N a 1 mL de muestra, fueron cerrados herméticamente y se dejó en la parrilla de calentamiento durante 2 h a 100 °C. El líquido restante se filtró y fue colocado en viales para su posterior análisis en HPLC.

Para la identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en las semillas de haba maduras y frescas sin digerir y en las diferentes fases del proceso de digestión *in vitro* se realizó el análisis en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Thermo Scientific Spectra System provisto con detector UV/visible fijado en 210 y 354 nm y se utilizó una columna Acclaim 120 C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 μm) Thermo Scientific.HPLC-UV.

La caracterización se llevó a cabo siguiendo la técnica de Wang et al., (2003) con ligeras modificaciones y se realizaron once curvas de calibración (de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$) con los estándares: ácido gálico, epigallocatequina (EGC), catequina,

epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina (EC), ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, quercetina-3- β -D-glucósido, quercetina y kaempferol.

La fase móvil constó de ácido fosfórico al 0.1% en agua (A), ácido fosfórico al 0.1% en metanol (B) y ácido fosfórico al 0.1% en acetonitrilo (C) (v/v). El programa de gradiente de elución se muestra en la tabla 6. El volumen de inyección fue de 0.040 mL y la velocidad de flujo se mantuvo a 1 mL/min durante un tiempo de ejecución total de 47 minutos.

Tabla 6 Gradiente de elución

Tiempo (min)	A	B	C
0	80	20	
5	80	20	
7	76	24	
10	76	24	
20	60	40	
25	65	10	25
30	70	15	15
35	40	35	25
45	80	20	
47	80	20	

6.4 Análisis *in silico*

Para conocer el potencial efecto de los flavonoides procedentes de semillas de haba madura y fresca, se realizó una interacción con los factores de transcripción PPAR- γ y C/EBP- β mediante un acoplamiento molecular, utilizando el programa AutoDock (Morris et al., 2009). Las estructuras de las proteínas PPAR- γ (secuencia 1PRG) y C/EBP- β (secuencia 1H89) fueron descargadas de la Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) (Berman et al., 2000). Las proteínas se prepararon eliminando las moléculas de agua, agregando los átomos de hidrógeno polares y las cargas de Kollman, para ser guardadas en formato pdbqt.

La estructura 2D de los flavonoides conocidos de las semillas de haba se descargaron de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) en formato sdf y luego fueron convertidos a formato mol2 utilizando el programa de

Avogadro. Los átomos de hidrógeno y las cargas de Gasteiger se agregaron utilizando las herramientas de AutoDock.

Para realizar una interacción precisa, el tamaño de la caja se diseñó en el sitio de unión. Los dominios de unión al ligando que se seleccionaron fueron Arg 280, Ile 262, Ile 341, Ser 342, Met 348, Ile 281, Leu 353, Met 343, Leu 330, Tyr 327, Met 364, Lys 367, His 449, Ser 289, Cys 285, Arg 288, Gly 284, His266, Phe 264 y Phe 287 (Aranaz et al., 2019; Prabhu & Rajeswari, 2018). Se empleó una zona de interacción centrada a 16.426 x 65.603 x 10.611 y con dimensiones de X= 46, Y=46 y Z=46 con un espaciamiento de 0.703 angstroms (Å), para PPAR- γ . Con respecto a C/EBP- β , el tamaño de la caja se diseñó cubriendo toda el área de la cadena A de la proteína. Se empleó una zona de interacción centrada a 64.587 x 28.615 x 58.744 y con dimensiones de X= 126, Y=66 y Z=66 con un espaciamiento de 0.703 angstroms (Å). La posición inicial, la orientación y las torsiones de las moléculas de ligando se establecieron al azar.

6.5 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos del proceso de digestión *in vitro* se utilizó estadística descriptiva y medidas de tendencia central como media y medidas de dispersión como desviación estándar. Todos los procedimientos se realizaron en dos lotes independientes por triplicado.

Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics versión 25. Los resultados de las muestras fueron evaluados mediante el análisis t de student para muestras independientes y ANOVA de un factor. El valor de p considerado como estadísticamente significativo si es <0.05 ($p<0.05$).

6.6 Ética

Toda la información generada de este trabajo es propiedad de la UANL, por lo que se guardara la confidencialidad de los datos.

En la presente investigación no existe la participación de seres humanos por lo que no fue necesaria la realización del consentimiento informado.

6.7 Implicaciones y medidas de bioseguridad

Para el desarrollo de la metodología se contemplará el uso correcto de las normas y reglas de seguridad del Laboratorio de Alimentos y del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, además del adecuado tratamiento y confinamiento de los desechos químicos y biológicos generados.

VII. RESULTADOS

7.1 Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

7.1.1 Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de las semillas de haba maduras y frescas y su bioaccesibilidad mediante un proceso de digestión *in vitro* se muestran en la tabla 7.

El contenido de polifenoles totales obtenidos de las semillas de haba madura y fresca en la fase intestinal (104.42 ± 8.89 y 121.35 ± 15.46 mg EAG/g, respectivamente) disminuyó significativamente en la fase bioaccesible después de la digestión *in vitro* (58.03 ± 3.62 y 63.31 ± 1.77 mg EAG/g, respectivamente). Observando que las semillas de haba fresca obtuvieron un contenido ligeramente mayor de polifenoles totales respecto a las semillas de haba madura, sin embargo, en cuanto al porcentaje de bioaccesibilidad no se observaron diferencias significativas aun cuando las semillas de haba madura presentan mayor porcentaje en la fase bioaccesible (55.57% vs 52.17%) como se muestra en la figura 8 ($p > 0.05$).

Tabla 7 Contenido y bioaccesibilidad de polifenoles totales en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión *in vitro*.

Haba	Fase de digestión	Polifenoles totales	
		mg EAG/g	%
Madura	Control	$117.98 \pm 13.43^{* b,d}$	100.00
	Fase gástrica	$79.71 \pm 8.32^{* a,c,d}$	67.56
	Fase intestinal	$104.42 \pm 8.89^{* b,d}$	88.51
	Fase bioaccesible	$58.03 \pm 3.62^{* a,b,c}$	55.57
Fresca	Control	$234.39 \pm 15.08^{B,C,D}$	100.00
	Fase gástrica	$89.67 \pm 6.93^{A,C,D}$	38.26
	Fase intestinal	$121.35 \pm 15.46^{A,B,D}$	51.77
	Fase bioaccesible	$63.31 \pm 1.77^{A,B,C}$	52.17

Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes y ANOVA de un factor. * Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca ($p < 0.05$). ^{a-d} ^{A-D} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las fases de digestión ($p < 0.05$). Los datos del % de bioaccesibilidad están basados en la fórmula %B. EAG: Equivalentes de Ácido Gálico.

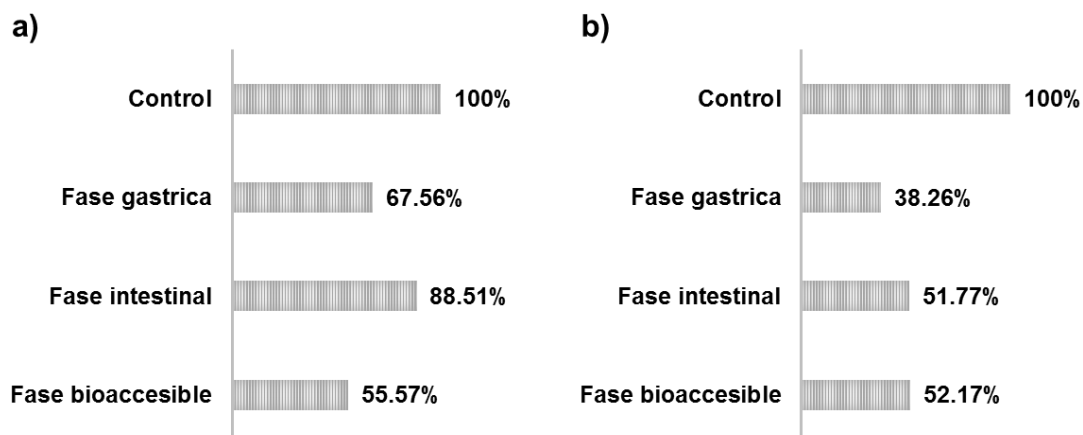


Figura 8 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: a) madura y b) fresca en polifenoles totales.

7.1.2 Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales de las semillas de haba maduras y frescas y su bioaccesibilidad mediante un proceso de digestión *in vitro* se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Contenido y bioaccesibilidad de flavonoides totales en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión *in vitro*.

Haba	Fase de digestión	Flavonoides totales	
		mg EC/g	%
Madura	Control	2.16 ± 0.26* b,c,d	100.00
	Fase gástrica	0.06 ± 0.03* a,c,d	2.65
	Fase intestinal	0.25 ± 0.02 a,b,d	11.51
	Fase bioaccesible	0.02 ± 0.01* a,b,c	6.62
Fresca	Control	5.60 ± 0.90 B,C,D	100.00
	Fase gástrica	0.11 ± 0.03 A,C	1.35
	Fase intestinal	0.23 ± 0.04 A,B,D	4.04
	Fase bioaccesible	0.10 ± 0.06 A,C	1.78

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar ($n=6$). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes y ANOVA de un factor. * Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca ($p<0.05$). ^{a-d} A-D Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las fases de digestión ($p<0.05$). Los datos del % de bioaccesibilidad están basados en la fórmula %B. EC: Equivalentes de Catequina.

El contenido de flavonoides totales obtenidos de las semillas de haba madura y fresca en la fase intestinal (0.25 ± 0.02 y 0.23 ± 0.04 mg EC/g, respectivamente) disminuyó significativamente en la fase bioaccesible de la digestión *in vitro* (0.02 ± 0.01 y 0.10 ± 0.06 mg EC/g, respectivamente). Observando que las semillas de haba fresca obtuvieron mayor contenido de flavonoides totales respecto a las semillas de haba madura.

Al analizar el porcentaje de bioaccesibilidad se observaron diferencias significativas siendo las semillas de haba madura las que presentan el mayor porcentaje en la fase bioaccesible (6.62% vs 1.78%) como se muestra en la figura 9 ($p < 0.05$).

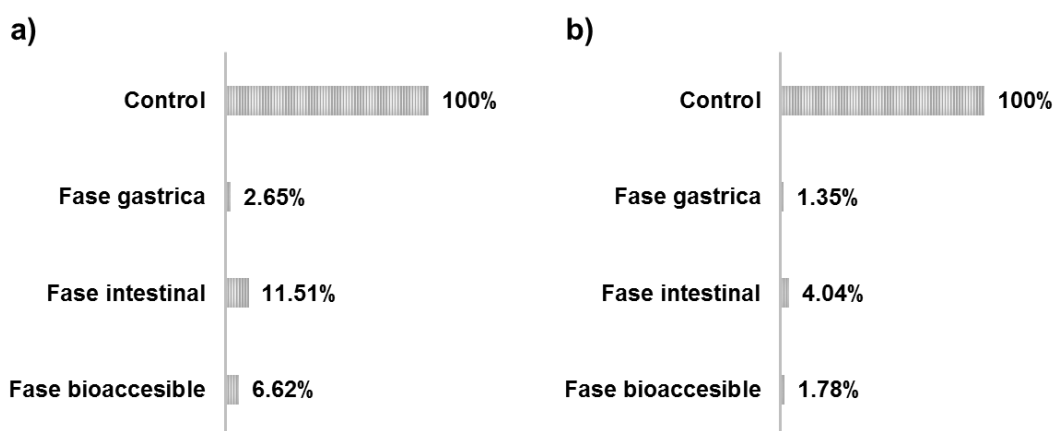


Figura 9 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: a) madura y b) fresca en flavonoides totales.

7.1.3 Capacidad antioxidante

El contenido de capacidad antioxidante de las semillas de haba maduras y frescas y su bioaccesibilidad mediante un proceso de digestión *in vitro* se muestran en la tabla 9.

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método FRAPP y DPPH. Los resultados obtenidos por el método de FRAP en las semillas de haba madura y fresca en la fase intestinal (329.70 ± 50.51 y 695.83 ± 38.38 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente) disminuyó significativamente en la fase bioaccesible de la digestión *in vitro* (122.67 ± 13.70 y 327.41 ± 88.37 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente).

Respecto al método DPPH, de la fase intestinal ($311.54 \pm 38.14 \mu\text{M ET/g}$ en haba madura y $500.25 \pm 36.76 \mu\text{M ET/g}$ en haba fresca), también disminuyó significativamente en la fase bioaccesible (218.16 ± 12.07 y $345.16 \pm 27.25 \mu\text{M ET/g}$, respectivamente).

Tabla 9 Contenido y bioaccesibilidad de capacidad antioxidante en semillas de haba maduras y frescas mediante un proceso de digestión *in vitro*.

Haba	Fase de digestión	Capacidad antioxidante			
		FRAP		DPPH	
		$\mu\text{M ET/g}$	%	$\mu\text{M ET/g}$	%
Madura	Control	$410.97 \pm 84.30^{* b,c,d}$	100	$359.96 \pm 25.92^{* b,d}$	100.00
	Fase gástrica	$239.07 \pm 49.81^{* a,c,d}$	58.17	$239.13 \pm 26.01^{* a,c}$	66.43
	Fase intestinal	$329.70 \pm 50.51^{* a,b,d}$	80.23	$311.54 \pm 38.14^{* b,d}$	86.55
	Fase bioaccesible	$122.67 \pm 13.70^{* a,b,c}$	37.21	$218.16 \pm 12.07^{* a,c}$	70.03
Fresca	Control	$907.73 \pm 86.82^{B,C,D}$	100	$654.50 \pm 23.68^{B,C,D}$	100.00
	Fase gástrica	$390.83 \pm 68.48^{A,C}$	43.06	$312.75 \pm 23.48^{A,C}$	47.78
	Fase intestinal	$695.83 \pm 38.38^{A,B;D}$	76.66	$500.25 \pm 36.76^{A,C,D}$	76.43
	Fase bioaccesible	$327.41 \pm 88.37^{A,C}$	47.05	$345.16 \pm 27.25^{A,C}$	69.00

Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes y ANOVA de un factor. * Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca ($p<0.05$). ^{a-d} ^{A-D} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las fases de digestión ($p<0.05$). Los datos del % de bioaccesibilidad están basados en la formula %B. ET: Equivalentes de Trolox.

Se observó que las semillas de haba fresca obtuvieron mayor capacidad antioxidante respecto a las semillas de haba madura en ambos métodos, sin embargo, en cuanto al porcentaje de bioaccesibilidad en ambos métodos no se observaron diferencias significativas entre las semillas de haba madura y las frescas. (figura 10) ($p>0.05$).

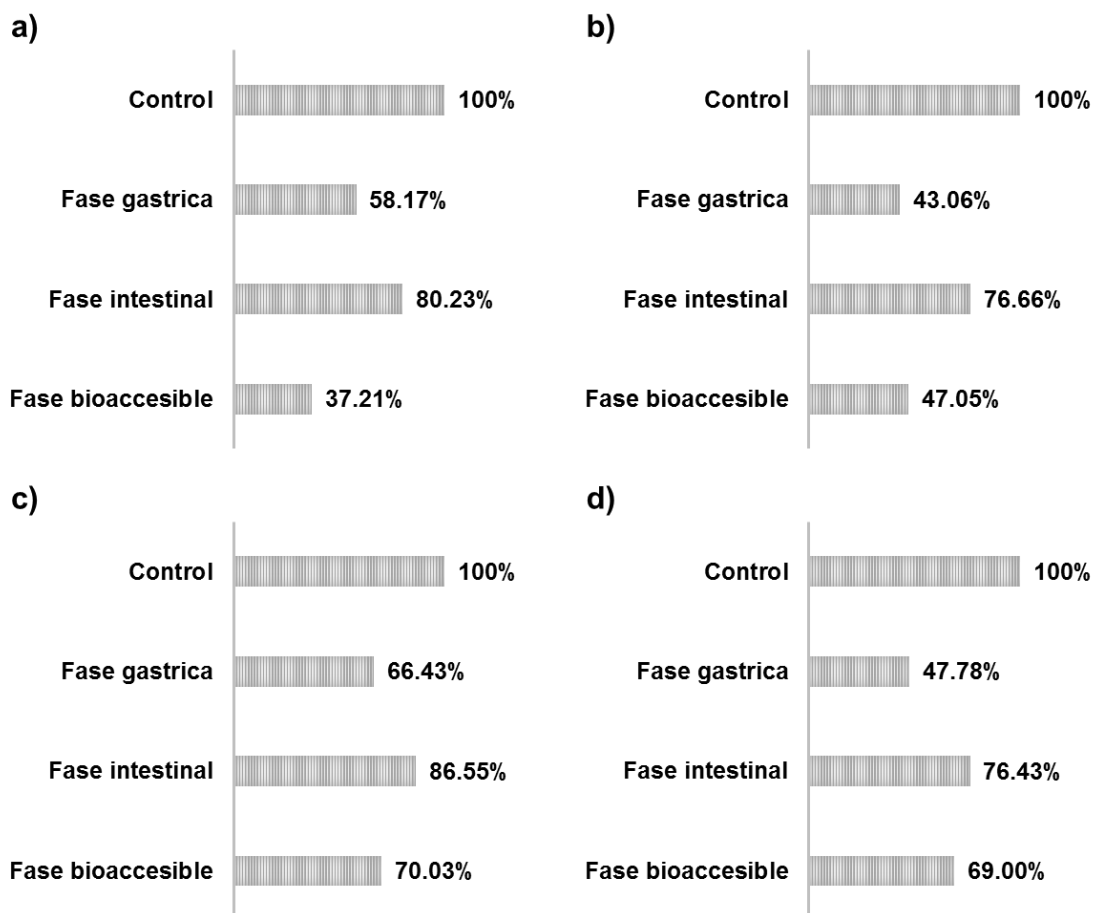


Figura 10 Porcentaje de bioaccesibilidad de semillas de haba: en FRAP a) madura y b) fresca y en DPPH c) madura y d) fresca.

7.2 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles.

El análisis mediante HPLC de las fases de las muestras de haba madura y haba fresca después de la digestión *in vitro* se realizó después del proceso de hidrólisis para determinar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en su forma libre (aglicona), debido a la gran cantidad de glucósidos que están presentes en las muestras y a las condiciones difíciles de separación de los mismos por los métodos cromatográficos por la similitud química de los compuestos, así como también la dificultad de adquirir estándares, por lo tanto, solo se analizaron en total 11 compuestos (8 flavonoides y 3 ácidos fenólicos). En la tabla 10 se observan los

resultados del contenido de compuestos fenólicos después del proceso de hidrolisis en las distintas fases de la digestión de las muestras de haba madura y fresca.

Tabla 10 Contenido de compuestos fenólicos de haba madura y haba fresca en las distintas fases de la digestión *in vitro*

Compuestos mg/100g	Haba	Control	Fase gástrica	Fase intestinal	Fase bioaccesible
Ácido gálico	Madura	17.62±0.44 ^{*a}	16.05±1.33 ^{*a}	9.24±2.34 ^{*b}	6.95±3.91 ^{*c}
	Fresca	75.15±8.26 ^A	77.04±7.07 ^A	63.37±5.15 ^A	48.13±5.37 ^B
Ácido clorogénico	Madura	0.28 ± 0.00 ^a	0.43 ± 0.07 ^{*a}	1.64 ± 0.28 ^{*b}	0.27 ± 0.02 ^a
	Fresca	0.40 ± 0.13 ^A	0.28 ± 0.01 ^A	0.44 ± 0.08 ^A	0.26 ± 0.01 ^A
Ácido cafeico	Madura	9.97 ± 1.07 ^{*a}	9.91 ± 2.68 ^a	1.73 ± 0.35 ^{*b}	1.52 ± 0.14 ^{*c}
	Fresca	17.81±1.12 ^A	12.34±2.66 ^B	19.10±2.37 ^A	8.38±2.91 ^C
EGC	Madura	3.41 ± 0.41 ^{*a}	1.86 ± 0.48 ^{*b}	4.21 ± 0.57 ^a	5.75 ± 1.29 ^{*a}
	Fresca	6.93 ± 0.14 ^A	7.61 ± 1.71 ^A	6.26 ± 2.16 ^A	16.25 ± 4.10 ^B
Catequina	Madura	16.08±1.14 ^{*a}	18.65±3.50 ^{*a}	30.04±2.32 ^{*b}	45.74±0.78 ^{*c}
	Fresca	34.21±0.63 ^A	35.61±1.10 ^A	83.51±4.41 ^B	72.88±1.75 ^C
EGCG	Madura	13.24±2.03 ^a	6.47±0.43 ^{*b}	24.33±0.69 ^{*c}	27.05±2.53 ^d
	Fresca	13.37±1.11 ^A	13.52±2.32 ^A	18.06±1.03 ^B	23.31±2.72 ^C
EC	Madura	5.96 ± 0.39 ^a	6.45 ± 2.15 ^a	5.06 ± 0.17 ^{*a}	2.33 ± 1.41 ^b
	Fresca	8.13 ± 1.51 ^A	7.25 ± 1.47 ^A	1.93 ± 0.92 ^B	2.96 ± 0.00 ^C
Rutina	Madura	9.90 ± 0.55 ^{*a}	9.94 ± 1.65 ^{*a}	6.74 ± 0.64 ^{*b}	2.70 ± 0.10 ^{*c}
	Fresca	4.47 ± 0.93 ^A	3.01 ± 0.25 ^B	2.99 ± 0.21 ^C	4.09 ± 0.61 ^A
Quercetina 3-β-D-g	Madura	0.43 ± 0.01 ^{*a}	0.32 ± 0.08 ^{*a}	0.29 ± 0.07 ^{*a}	0.39 ± 0.08 ^{*a}
	Fresca	4.38 ± 0.34 ^A	4.87 ± 0.54 ^A	4.05 ± 0.31 ^A	3.06 ± 0.24 ^B
Quercetina	Madura	2.15 ± 0.83 ^a	7.61 ± 2.05 ^{*b}	5.76 ± 2.07 ^a	1.36 ± 0.45 ^{*a}
	Fresca	2.89 ± 0.92 ^A	3.03 ± 0.21 ^A	2.37 ± 0.29 ^A	2.80 ± 0.31 ^A
Kaempferol	Madura	0.71 ± 0.00 ^a	1.08 ± 0.05 ^{*b}	0.71 ± 0.00 ^a	0.73 ± 0.02 ^a
	Fresca	0.72 ± 0.02 ^A	0.71 ± 0.00 ^A	0.71 ± 0.01 ^A	0.72 ± 0.01 ^A

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes y ANOVA de un factor. * Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca ($p < 0.05$). ^{a-c A-C} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las fases de digestión ($p < 0.05$). EGC: Epigallocatequina. EGCG: Galato de epigallocatequina. EC: Epicatequina.

El haba fresca antes de la digestión presentó las mayores concentraciones de ácido gálico, epigallocatequina (EGC), catequina, ácido cafeico, quercetina 3-β-D-glucósido, y quercetina, en cambio, la concentración de rutina fue mayor en el haba

madura. Respecto a EGCG y kaempferol presentaron valores muy similares en los controles de ambas muestras.

En la figura 11, 12 y 13 se muestran las gráficas de los compuestos que se analizaron en las distintas fases del proceso de digestión del haba madura y fresca. El análisis estadístico t-student permitió comparar las diferencias significativas entre el haba madura y el haba fresca en la fase gástrica, intestinal, bioaccesible y el control (muestras sin digerir).

En las muestras de la fase gástrica se observó una diferencia significativa en EGC, catequina, EGCG, rutina, quercetina 3-β-D-glucósido, quercetina y kaempferol comparando haba madura y fresca ($p < 0.05$). Donde el haba fresca presenta mayor concentración en EGC, catequina, EGCG y quercetina 3-β-D-glucósido, mientras que el haba madura obtuvo mayor concentración en rutina, quercetina y kaempferol.

El análisis de la fase intestinal del haba verde y el haba fresca, los compuestos: catequina, EGCG, EC, rutina, quercetina 3-β-D-glucósido fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Destacó que el haba madura presentó la mayor concentración en EGCG, EC, rutina y quercetina, aunque no existieron diferencias significativas para EGC, quercetina y kaempferol ($p > 0.05$).

El contenido de EGC, catequina, rutina, quercetina y quercetina 3-β-D-glucósido en la fase bioaccesible mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca, siendo la muestra de haba fresca la que presenta el mayor contenido de los flavonoides mencionados ($p < 0.05$). Mientras que en EGCG, EC y kaempferol, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

El análisis estadístico ANOVA permitió comparar las diferencias significativas entre las fases gástrica, intestinal, bioaccesible y el control (muestras sin digerir) del haba madura y fresca. El contenido EC de haba madura y fresca de la fase bioaccesible fue estadísticamente menor que las muestras sin digerir, en el caso de rutina solo se encontró una disminución en el haba madura y para quercetina 3-β-D-glucósido disminuyó en el haba fresca ($p > 0.05$). Por otro lado, el contenido de catequina y de EGCG de ambas muestras fue estadísticamente mayor que las muestras sin digerir,

en cambio EGC solo fue estadísticamente mayor en el haba fresca ($p>0.05$). Con respecto a los compuestos quercetina y kaempferol, no se observaron diferencias significativas antes y después de la digestión gastrointestinal *in vitro* en haba madura y fresca.

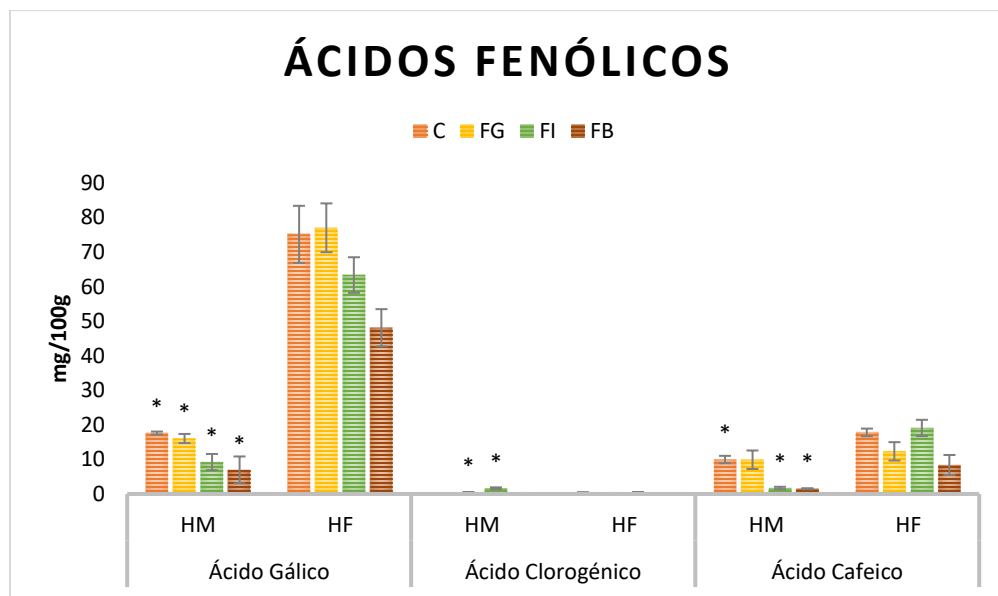


Figura 11 Contenido de ácidos fenólicos de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes. *: Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca, ($p<0.05$). C: control sin digerir. FG: fase gástrica. FI: fase intestinal. FB: fase bioaccesible. HM: haba madura. HF: haba fresca.

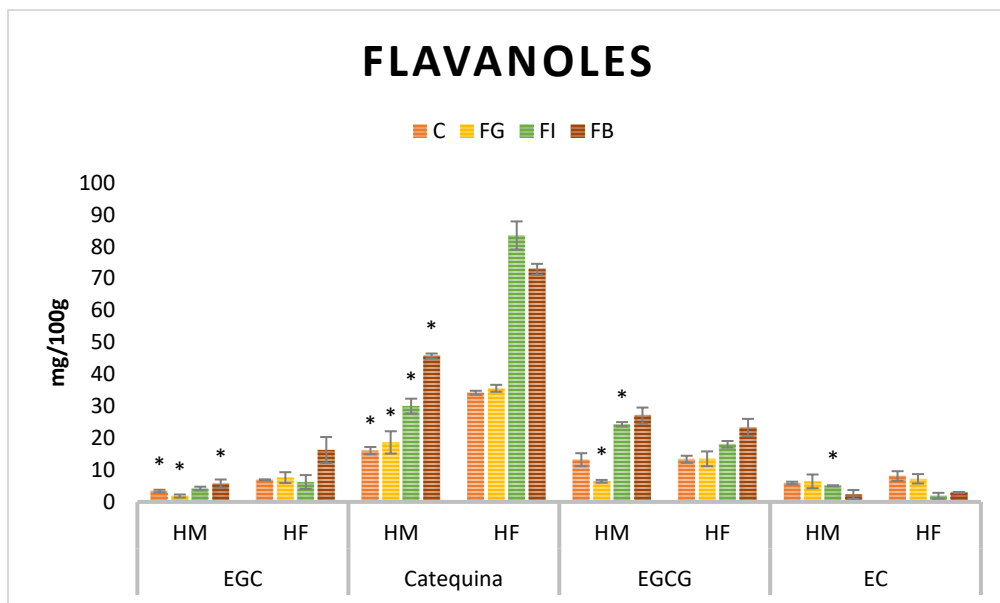


Figura 12 Contenido flavanoles de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g).

Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes. *: Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca, ($p < 0.05$). C: control sin digerir. FG: fase gástrica. FI: fase intestinal. FB: fase bioaccesible. HM: haba madura. HF: haba fresca. EGC: Epigallocatequina. EGCG: Galato de epigallocatequina. EC: Epicatequina.

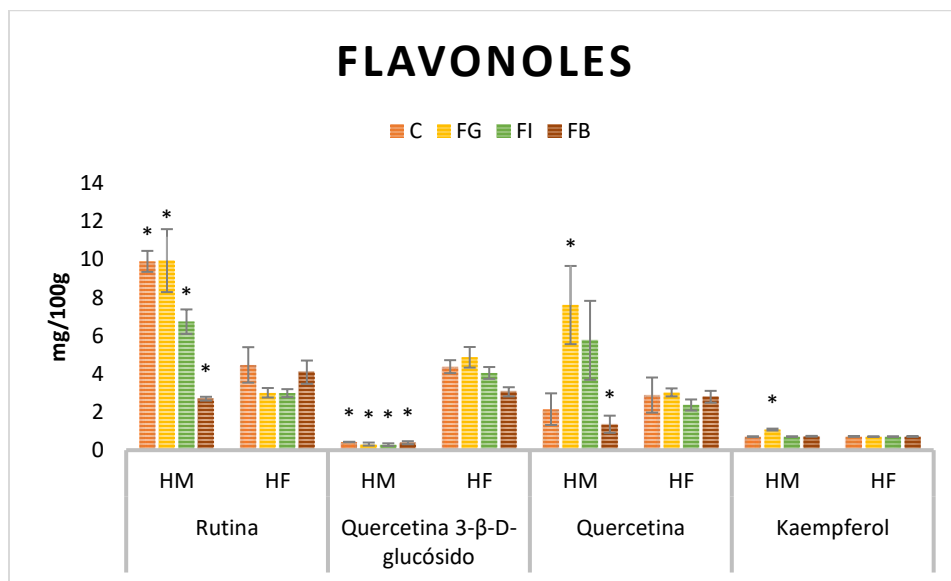


Figura 13 Contenido flavonoles de haba madura (HM) y haba fresca (HF) (mg/100g).

Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student para muestras independientes. *: Diferencia estadísticamente significativa entre el haba madura y fresca, ($p < 0.05$). C: control sin digerir. FG: fase gástrica. FI: fase intestinal. FB: fase bioaccesible. HM: haba madura. HF: haba fresca. EGC: Epigallocatequina. EGCG: Galato de epigallocatequina. EC: Epicatequina

7.3 Energía de unión ligando-receptor (PPAR γ y C/EBP β) *in silico*.

Los flavonoides presentes en las semillas de haba maduras y frescas fueron utilizados como ligandos. Los valores de energía de unión de ligando-receptor PPAR γ obtenidos del programa AutoDock Tools se muestran en la tabla 11, y en la figura 14 se muestran los enlaces intermoleculares que se forman entre los ligandos y el receptor PPAR γ .

Tabla 11 Energías de unión y residuos de aminoácidos de unión entre ligando-receptor PPAR γ .

Ligandos	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos de unión al receptor
Troglitazona	-6.53	LEU228, HIS266, ARG280, GLU291
Quercetina	-6.96	SER342, LEU228, GLU291
Catequina	-6.79	SER342, GLU291, GLU295, ILE326, LEU340
Epigallocatequina	-5.18	GLU259, ASP260
Galato de epigallocatequina	-9.50	ARG280, HIS266
Epicatequina	-6.96	SER342, LEU228, GLU291, GLU295, ILE326, LEU340
Galocatequina	-6.51	SER342, LEU228, GLU343, GLU291, GLU295, LEU340
Rutina	-3.27	*
Kaempferol	-6.69	SER342, LEU228, GLU343, GLU291, GLU295, ILE326
Buteina	-6.76	ARG280, GLU259, SER342

(n=3). * No formó ningún puente de hidrógeno con los residuos.

La energía de unión proveniente del fármaco troglitazona, el cual se utilizó como referencia, obtuvo una energía de unión de -7.23 kcal/mol. El ligando galato de epigallocatequina obtuvo el resultado más eficiente (-9.5 kcal/mol), respecto a los demás ligandos, obtuvieron valores similares. Los residuos de aminoácidos que están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno en el caso del galato de epigallocatequina fueron ARG280 y HIS266, para los ligandos restantes coincidieron que los residuos con los que normalmente forman puente de hidrógeno son SER342 y GLU291, excepto epigallocatequina, que formó puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos GLU259 Y ASP260.

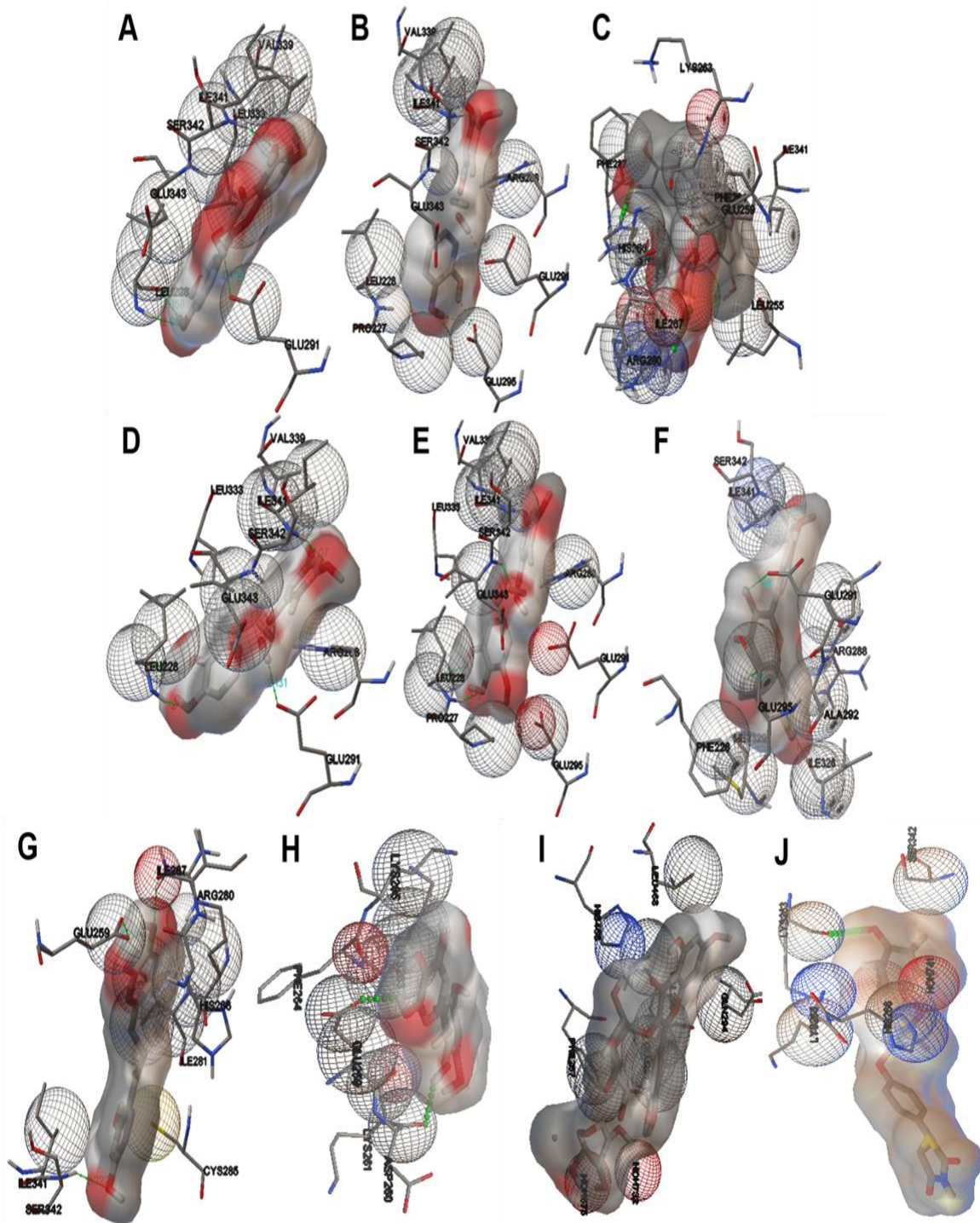


Figura 14 Representación de la interacción específica de diferentes flavonoides presentes en las semillas de haba con PPAR γ . Sitio de unión de PPAR γ con quercetina(A), catequina (B), epigallocatequina galato (C), epicatequina (D), galcatequina (E), kaempferol (F), buteina (G), epigallocatequina (H) y rutina (I).

Los valores de energía de unión ligando-receptor C/EBP β obtenidos del programa AutoDock Tools se muestran en la tabla 12 y en la figura 15 se muestran los enlaces intermoleculares que se forman entre los ligandos y el receptor C/EBP β .

Tabla 12 Energías de unión y residuos de aminoácidos de unión entre ligando-receptor C/EBP β .

Ligandos	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos de unión al receptor
Troglitazona	-3.23	*
Quercetina	-3.88	ASP290, ASN296
Catequina	-3.80	ARG328
Epigallocatequina	-3.14	MET294
Galato de epigallocatequina	-	-
Epicatequina	-4.43	GLU336, LYS332
Galocatequina	-3.90	ARG328
Rutina	-1.25	LYS293, GLN300
Kaempferol	-4.13	ARG328
Buteina	-3.68	ARG328

(n=3). * No formó ningún puente de hidrógeno con los residuos.

La energía de unión proveniente del fármaco troglitazona fue de -3.23 kcal/mol, valor que fue utilizado como referencia. El ligando epicatequina obtuvo el resultado mayor (-4.43 kcal/mol), respecto a los demás ligandos, obtuvieron valores que van de -1.25 a -4.13 kcal/mol. Los residuos de aminoácidos que están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno en el caso de la epicatequina son GLU336 y LYS332, para los ligandos restantes coincidieron la mayoría en el residuo ARG328, excepto el ligando quercetina (ASP290 y ASN296), rutina (LYS293 y GLN300) y epigallocatequina (MET294). En el caso del galato de epigallocatequina mediante los programas utilizados no se obtuvieron resultados del acoplamiento molecular debido a un error que presentaron dichos programas.

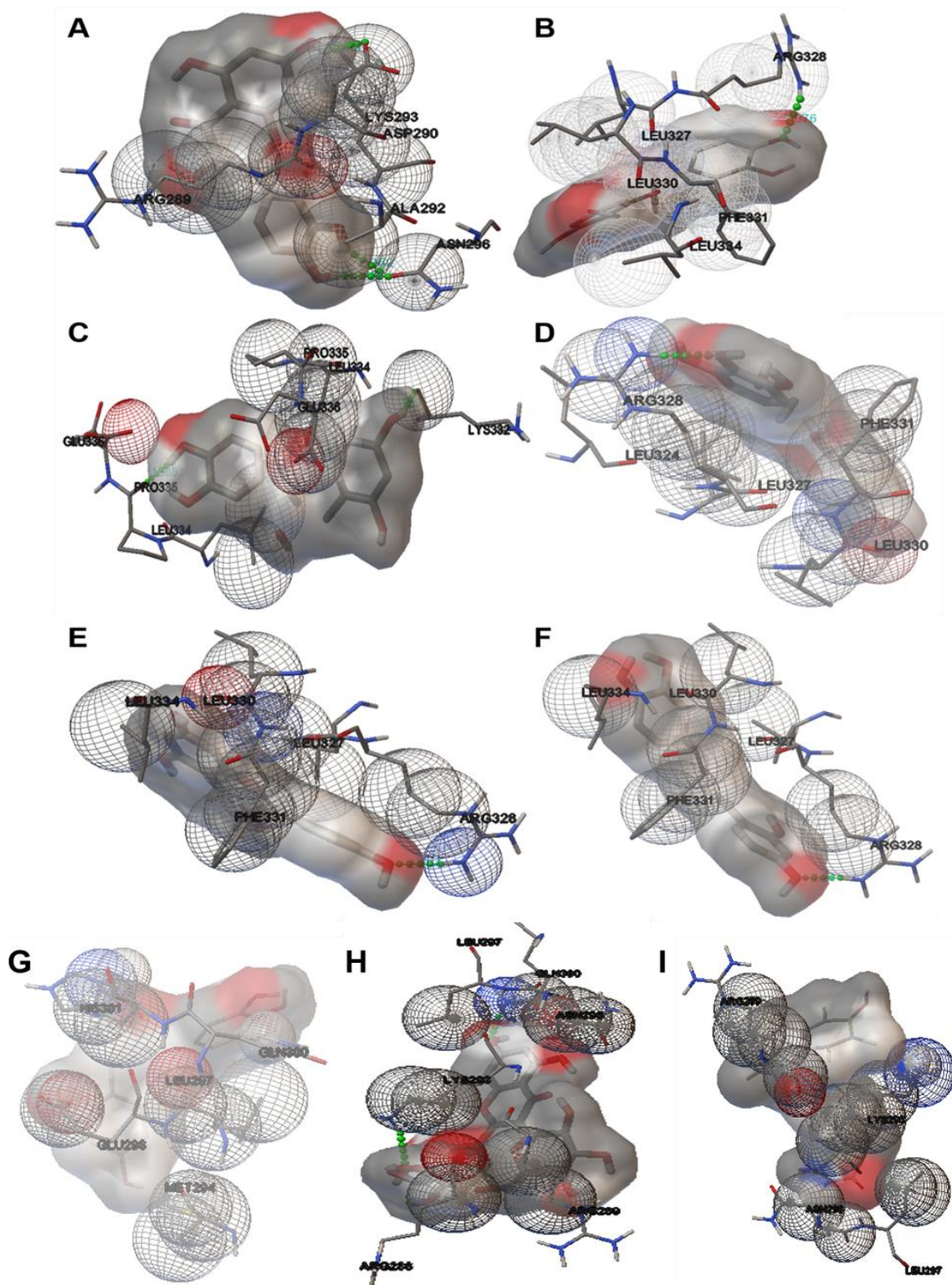


Figura 15 Representación de la interacción específica de diferentes flavonoides presentes en las semillas de haba con C/EBPβ. Sitio de unión de PPARγ con quercetina(A), catequina (B), epicatequina (C), galcatequina (D), kaempferol (E), buteina (F), epigallocatequina (G), rutina (H) y troglitazona (I).

VIII. DISCUSIÓN

Los flavonoides son compuestos fenólicos a los cuales se les atribuyen diversos efectos benéficos en la salud. Sin embargo, la evidencia existente sobre los posibles efectos es controversial, esto puede ser ocasionado por la estructura química de los compuestos y por el proceso de metabolización, en donde la bioaccesibilidad de los compuestos es un punto clave para que puedan llegar a cumplir su función en el organismo (Angelino et al., 2017; Mtolo et al., 2017).

Por tanto, el creciente interés por conocer los efectos que presentan los compuestos bioactivos en la salud humana ha ido en aumento. Una estrategia útil para esclarecer estos conocimientos es identificando el destino de los alimentos y sus componentes mediante una digestión gastrointestinal. Para esto se han utilizado diversos métodos, entre ellos los métodos digestivos *in vitro*, los cuales son comúnmente utilizados debido a que son fáciles de usar y económicos (Brodkorb et al., 2019; Tarko et al., 2013). Asimismo, se han evaluado diversos fitoquímicos, como carotenoides, polifenoles, fitoesteroles y otros componentes de diferentes matrices alimentarias (Bohn et al., 2018). Por lo que es de importancia científica evaluar el comportamiento de los flavonoides provenientes del haba mediante la simulación de la digestión gastrointestinal, debido a que existe escasa información científica sobre este proceso en dicha leguminosa.

8.1 Bioaccesibilidad de polifenoles totales de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión *in vitro*.

Los resultados observados de polifenoles totales en las muestras sin digerir de haba madura y fresca (117.98 ± 13.43 y 234.39 ± 15.08 mg EAG/g, respectivamente) fueron superiores a los reportados en otros estudios realizados en haba. En donde se han observados variaciones en los diferentes cultivos, etapas y en las diferentes partes del haba sin digerir, como la semilla, la vaina entera, la cubierta de la vaina, la cubierta de la semilla los cotiledones y las flores, siendo la cubierta de la semilla la que presentan mayor concentración de polifenoles totales (68.54 ± 2.39 y 41.46

± 0.78 mg EAG/g en haba fresca y madura, respectivamente), seguido de la cubierta de la vaina (67.38 ± 1.95 mg EAG/g), la vaina entera (57.18 ± 0.60 mg EAG/g), las semillas (36.35 ± 0.37 y 30.22 ± 0.68 mg EAG/g en haba fresca y madura, respectivamente) y, con menor concentración los cotiledones (12.31 ± 0.59 y 4.00 ± 0.59 mg EAG/g en haba fresca y madura, respectivamente) (Boukhanouf et al., 2016).

Los valores de polifenoles totales en semillas de haba maduras y frescas en la fase bioaccesible (58.03 ± 3.62 y 63.31 ± 1.77 mg EAG/g, respectivamente) fueron superiores a los reportados por otros autores. Luo et al., (2014) encontraron concentraciones menores a los reportados en el presente estudio, reportando 8.79 ± 1.23 mg EAG/g en habas provenientes de Nanjing, Provincia de Jiangsu, China. También Zhu et al., (2020) reportan concentraciones de 1.97 ± 0.13 mg EAG/g en semillas provenientes de Nanchang, Jiangxi, China. Sin embargo, las semillas en crudo no fueron sometidas a ningún tratamiento (térmico, secado, etc.) y no especifican si la semilla de haba fue analizada en su etapa madura o fresca en ninguno de los dos estudios. Por lo tanto, existen diversos factores como el origen del cultivo, la composición de la matriz alimentaria y la fracción de esta, que influye al momento de analizar los polifenoles totales.

Respecto al porcentaje de bioaccesibilidad en polifenoles totales, Luo et al., (2014) reportan un 38.37%, sin embargo, estos autores utilizaron una metodología de digestión gastrointestinal diferente al método INFOGEST que fue el utilizado en el presente estudio. Este resultado se encuentra por debajo de los que se observaron en este estudio (55.57% y 52.17%), en donde los demás componentes nutricionales de las semillas de haba podrían estar interviniendo. Aunque en el presente estudio, el haba fresca presenta mayor concentración de compuestos fenólicos, nuestros datos de bioaccesibilidad muestran que es menos bioaccesible, lo que puede ser ocasionado por los compuestos químicos presentes, ya que se ha reportado que el haba fresca presenta en su mayoría compuestos conjugados como dímeros de prodelfinidina, quercetina 3-O-rutinósido, apigenina 7-O-glucósido, miricetina-3-O-glucósido, quercetina 3-O-glucósido (Singh et al., 2017).

8.2 Bioaccesibilidad de flavonoides totales de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión *in vitro*.

Los resultados observados en las muestras de haba madura y fresca sin digerir (2.16 ± 0.26 y 5.60 ± 0.90 mg EC/g, respectivamente) fueron similares a los reportados por otros autores. Con respecto a un estudio realizado por El-Mergawi & Taie, (2014), reportaron concentraciones que variaban entre 2.73-4.40 mg EQ/g dependiendo del cultivar sin digerir analizado. Además, se debe tomar en cuenta que en este estudio utilizaron quercetina para realizar la curva de calibración y expresar los resultados, por tanto, puede ser esta la causa de que exista variación en las concentraciones de este y el presente estudio.

Los valores de flavonoides totales en semillas de haba maduras y frescas en la fase bioaccesible (0.02 ± 0.01 y 0.10 ± 0.06 mg EC/g, respectivamente) fueron inferiores a los reportados por otros autores. Zhu et al., (2020) observaron concentraciones mayores a las reportadas en el presente estudio, reportando 0.44 ± 0.08 mg EC/g, cabe mencionar que estos autores utilizaron la misma metodología de digestión gastrointestinal que el presente estudio, pero para la determinación de flavonoides totales se utilizó una metodología diferente y esto puede estar causando las diferencias en los resultados. Asimismo, Luo et al., (2014) reportan concentraciones de 0.24 ± 0.03 mg EC/g después de un proceso de digestión. Además, la disminución observada en la concentración puede resultar del proceso de digestión y sus diferentes fases, ya que durante el proceso puede ocurrir tanto la liberación de compuestos fenólicos, como su degradación, debido a su susceptibilidad. De igual manera la actividad enzimática y las condiciones de pH favorecen la hidrólisis de macromoléculas, debido a esto, en el presente estudio se observa que la fase intestinal fue más eficiente que la fase gástrica, lo que se puede atribuir a la presencia de enzimas (Mtolo et al., 2017).

Respecto a el porcentaje de bioaccesibilidad en flavonoides totales, en el presente estudio se encontraron valores bajos. En el caso de haba madura fue de 6.62%, mientras que para haba fresca obtuvo un 1.78%. Sin embargo, existe escasez de

información en cuanto a los efectos del proceso de digestión *in vitro* en el haba en esta determinación. En el caso de Luo et al., (2014), no identificaron porcentaje de bioaccesibilidad de flavonoides totales en haba. Otros autores como Etcheverry et al., (2012); Lafarga et al., (2019); Liu et al., (2021) evalúan el porcentaje de bioaccesibilidad del haba utilizando diferentes métodos de análisis, por lo tanto, esa puede ser la causa de que se obtengan resultados diferentes a los del presente estudio.

8.3 Capacidad antioxidante de semillas de habas maduras y frescas durante una digestión *in vitro*.

La capacidad antioxidante proviene de la acción conjunta de compuestos como los flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitamina C, entre otros, los cuales se encuentran presentes en diversos alimentos. Asimismo, se ha encontrado que los polifenoles son uno de los antioxidantes naturales que más se han estudiado (Chaieb et al., 2011; Salehi et al., 2021). Los antioxidantes se conocen por la capacidad que tiene de retardar o inhibir la oxidación y así proteger al organismo de la acción de los radicales libres, que son los causantes de la aparición de diversas enfermedades (Leos-Rivas et al., 2016; Pisoschi et al., 2016; Šibul et al., 2016). Por lo que determinar la capacidad antioxidante puede considerarse como un previo de las propiedades benéficas de dichos alimentos en el organismo.

Los valores de las muestras de haba madura y fresca sin digerir para el método FRAP fueron 410.97 ± 84.30 y 907.73 ± 86.82 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones disminuyeron estadísticamente en la fase bioaccesible (122.67 ± 13.70 y 327.41 ± 88.37 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente), aunque cabe mencionar que presentaron una capacidad antioxidante mayor a lo reportado por otros autores. Kwon et al., (2018) evaluó cinco genotipos de haba y reportó concentraciones que iban de 17.5 a 22.3 $\mu\text{mol/g}$, siendo el genotipo de Hungría el que obtuvo el rango mayor. Del mismo modo, Siah et al., (2014) reportó que el extracto de semillas de haba madura presentaba 18.2 $\mu\text{molFe}^{2+}\text{eq/g}$ y este podía aumentar a 19.7 $\mu\text{molFe}^{2+}\text{eq/g}$ si las semillas se tostaban durante 120 min. Con

respecto a las semillas de haba maduras y frescas sin digerir para el método DPPH se observaron concentraciones de 359.96 ± 25.92 y 654.50 ± 23.68 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente, mismas que disminuyeron estadísticamente en la fase bioaccesible (218.16 ± 12.07 y 345.16 ± 27.25 $\mu\text{M ET/g}$, respectivamente), pero presentaron una capacidad antioxidante mayor a lo reportado por otros autores. Boukhanouf et al., (2016) observaron que el extracto de las semillas frescas sin digerir presentaba mayor contenido de capacidad antioxidante por el método DPPH en comparación con las semillas maduras (19.10 ± 1.62 y 5.89 ± 0.48 mg EAG/g, respectivamente), lo cual es consistente con lo reportado en el presente estudio. Por otro lado, Siah et al., (2014) observó que las semillas maduras presentaban una capacidad antioxidante de 53.4 $\mu\text{molTE/g}$ y esta capacidad podía disminuir si las semillas se sometían a un tostado. Sin embargo, estos resultados pueden variar porque se utilizaron diferentes unidades ($\mu\text{M ET/g}$, mg EAG/g y $\mu\text{molTE/g}$) a las que se utilizaron el presente estudio para expresar los resultados.

8.4 Identificación y caracterización de los flavonoides bioaccesibles

Los compuestos bioactivos son responsables del color, el gusto y el sabor de las leguminosas. También se les atribuyen diversas funciones biológicas como la protección contra el estrés oxidativo y enfermedades crónico degenerativas, dentro de las cuales destacan los efectos antiadipogénicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, etc (Chaieb et al., 2011; Singh et al., 2017). Las concentraciones de compuestos tienden a ser variadas de una leguminosa a otra, incluso entre la misma especie, eso se debe a la variedad de la semilla, las condiciones climáticas, la temperatura, el tiempo de maduración, las condiciones de procesamiento, los métodos de extracción y los métodos de cocción (Giusti et al., 2019; Moreno-Valdespino et al., 2020).

En las muestras de haba sin digerir, los principales flavonoides previamente reportados son la catequina (12.83 - 14.29 mg/100g), EC (22.51 - 28.96 mg/100g), EGC (14.03 - 15.47 mg/100g) y en menor concentración, la quercetina (2.00 mg/100g) (Bhagwat et al., 2014; Rothwell et al., 2013). Lo anterior, coincide con el

compuesto catequina, que en la muestra de haba madura es de los que presentaron mayor concentración (16.08 ± 1.14 mg/100g), mientras que en el haba fresca se encontraron concentraciones más bajas de EGC, EGCG y EC (6.93 ± 0.14 , 13.37 ± 1.11 mg/100g), solamente el compuesto catequina fue mayor (34.21 ± 0.63 mg/100g) que lo reportado por otros autores.

Las concentraciones observadas para catequina están dentro del rango reportado por algunos autores. Se han encontrado valores que van desde 8.46 ± 0.87 hasta 97.83 ± 1.83 mg/100g según las diferentes variedades analizadas (Baginsky et al., 2013; Giusti et al., 2017). En el caso del flavonol epicatequina, se han reportado valores más elevados que los obtenidos en el presente estudio, como es el caso de Baginsky et al., (2013), quienes analizaron diez diferentes variedades de haba fresca y observaron valores de 14.82 ± 1.17 a 77.39 ± 1.15 mg/100g. Cabe destacar que en el presente estudio los análisis se realizaron a partir de la harina cruda de dos etapas de maduración de la semilla (fresca y madura) y los autores antes mencionados realizaron sus determinaciones partiendo de un extracto, por lo que sus resultados pueden ser más elevados, debido a que en el extracto se encuentran concentrados los compuestos fenólicos. Además, es poco común que se especifique la etapa en que se encontraba la semilla que están analizando, por lo que es complicado realizar una comparación.

La simulación del proceso de digestión gastrointestinal es útil para evaluar la estabilidad de los compuestos fenólicos. Ya que existen diversos estudios que difieren en cuanto a la bioaccesibilidad y biodisponibilidad, debido a que la absorción de los compuestos puede ser limitada, puede variar de un compuesto a otro y también puede depender de la matriz alimentaria de donde provienen (Chen et al., 2018; Tarko et al., 2020).

De la fase inicial a la fase final del proceso de digestión, se ha demostrado que existe una degradación de los compuestos fenólicos, por lo que las concentraciones pueden incrementar o disminuir, incluso se han identificado nuevos compuestos totalmente diferentes después de la digestión, debido a su proceso de metabolización (Silva et al., 2018). En el caso de la catequina, los resultados del

presente estudio son consistentes con lo reportado por el autor Zhu et al., (2020), en donde se observó que de la fase oral a la fase intestinal hubo un aumento en la concentración de este compuesto en el haba (FO: 0.90 ± 0.19 , FG: 1.05 ± 0.32 , FI: 3.66 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$), en el caso de quercetina y rutina no se identificaron concentraciones en ninguna de las fases. De la misma manera, en el presente estudio se observó un incremento de la concentración de catequina de la fase gástrica hasta la fase bioaccesible, lo cual puede ser explicado por los cambios de las condiciones del método de digestión (Governata et al., 2021). En cuanto a los compuestos quercetina y rutina ocurrió una disminución de la concentración conforme transcurría el proceso de digestión, lográndose identificar en bajas concentraciones en un rango de 1.36 ± 0.45 a 4.09 ± 0.61 mg/100g en la fase bioaccesible. La reducción parcial o completa de estos compuestos ha sido observada en diferentes variedades de tomate (Peanparkdee et al., 2020). Quienes consideran que esto puede ser ocasionado por la acción de los cambios de pH, las enzimas, las sales biliares y la temperatura durante o después del proceso de digestión gastrointestinal, lo que llega a ocasionar la degradación de los compuestos. (Peanparkdee et al., 2020). Además, durante la digestión gastrointestinal los compuestos fenólicos pueden verse influenciados por los diferentes componentes de la matriz alimentaria, como lo son las proteínas, los lípidos y/o la fibra (Barros et al., 2020). Lo que puede explicar porque algunos compuestos tuvieron un incremento mayor de concentración en la fase intestinal o bioaccesible más que el haba madura y fresca sin digerir.

Por otro lado, la degradación de EC después de la digestión *in vitro* de ambas muestras de haba puede explicar el aumento en las concentraciones de catequina observadas, ya que puede ocurrir una conversión de EC en catequina, como consecuencia de cambios en el pH y la temperatura, y en modelos *in vivo* se observa este cambio y se argumenta que es debido a la microbiota. Asimismo, se ha observado que las concentraciones de ácido gálico aumentan debido a la hidrólisis en los galatos de EGC y EGCG (Governata et al., 2021). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron disminuciones en las concentraciones de EGC y EGCG, sino un aumento, y una disminución en el ácido gálico en haba madura y haba

fresca, por lo que podrían estar influyendo otros aspectos, incluso el mismo método de digestión *in vitro*, por lo anterior mencionado.

8.4 Energía de unión ligando-receptor (PPAR γ y C/EBP β)

El acoplamiento molecular es una herramienta que se ha utilizado con mayor frecuencia en los últimos años, ya que tiene la capacidad de predecir la conformación de diferentes ligandos en el sitio de unión de una proteína de interés. En donde las conformaciones con mínima energía son las más estables, es decir entre más negativo sea el valor, hay una mayor afinidad ligando receptor. A su vez, el cálculo de la energía de unión es la suma de interacciones moleculares (Van der Waals, enlaces de hidrógeno, electrostáticos e hidrófobos) (Ferreira et al., 2015; Jacob et al., 2012).

El proceso de diferenciación celular de preadipocitos a adipocitos se le conoce como adipogénesis. Dicho proceso ha sido constantemente estudiado en diversos modelos de estudio debido a que cuando existe disfunción de los adipocitos ocasiona la aparición de la obesidad y otras comorbilidades (Kuri-Harcuch et al., 2019; Mota de Sá et al., 2017). La adipogénesis se encuentra regulada por diferentes factores de transcripción, entre ellos C/EBP β , que es esencial en las primeras etapas de la diferenciación, debido a que su función principal es activar la expresión de otro factor de transcripción clave involucrado en la adipogénesis que es PPAR γ , este junto con C/EBP α , participan en la etapa final de la diferenciación de los adipocitos (Figura 2) (Guo et al., 2015; Mota de Sá et al., 2017). Por lo tanto, se han utilizado ambos factores de transcripción para identificar flavonoides con potencial actividad antiadipogénica (PPAR γ y C/EBP β). Con respecto a PPAR γ se han identificado diversos residuos de aminoácidos del receptor (Arg 280, Ile 262, Ile 341, Ser 342, Met 348, Ile 281, Leu 353, Met 343, Leu 330, Tyr 327, Met 364, Lys 367, His 449, Ser 289, Cys 285, Arg 288, Gly 284, His266, Phe 264 y Phe 287) como sitios de unión para los ligandos con actividad antiadipogénica (Aranaz et al., 2019; Prabhu & Rajeswari, 2018). En cuanto a C/EBP β , en la revisión de literatura no se encontraron datos de los residuos de aminoácidos de unión al receptor con los que

interactúan los compuestos fenólicos, pero cabe mencionar que es necesario que C/EBP β sufra una fosforilación para que pueda unirse al ADN. Además, diversos estudios han evaluado la capacidad del ácido retinoico y del receptor de ácido retinoico como posibles ligando de C/EBP β , debido a que estos pueden interferir en su actividad (Chung et al., 2021; Ohoka et al., 2009; Schwarz et al., 1997). Por lo que el generar la información de cuales ligandos se unen de manera más eficiente a C/EBP β y cuáles son los sitios de unión, es valor agregado, al ser la primera referencia sobre el tema.

En diversas investigaciones, se han propuesto diferentes moléculas como ligandos de PPAR γ y C/EBP β , entre ellas se encuentran las tiazolidinedionas, también conocidas como glitazonas, que han sido utilizadas en el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Sauer et al., 2015; Aranaz et al., 2019; Sharma et al., 2020). En el presente estudio se utilizó como control la troglitazona para comparar la afinidad de unión que tienen los diferentes flavonoides con los factores de transcripción. La energía de unión que presentó la troglitazona fue de -6.53kcal/mol para PPAR γ y -3.23 kcal/mol para C/EBP β , valores que fueron más bajos que lo reportado por otros autores. Esto puede ser ocasionado por la plataforma utilizada, la forma de preparación, la posición inicial, la orientación y las torsiones de las moléculas que se realizan al azar (Aranaz et al., 2019).

Del mismo modo, se observaron que los diferentes flavonoides exhibieron diferentes afinidades de unión a PPAR γ . El ligando que presenta el valor mínimo de energía fue epigallocatequina (-9.5 kcal/mol), formando puentes de hidrógeno con los residuos del receptor en ARG280, HIS266, mismos que coinciden con lo reportado por otros autores. Aranaz et al., (2019) reportaron que HIS266 y ARG280 fueron los residuos que estuvieron implicados en la interacción ligando-receptor, por lo que pueden ser los responsables de modular la actividad de PPAR γ . En el caso de quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, kaempferol y buteína, exhibieron una energía de unión similar. Respecto a los residuos de aminoácidos de PPAR γ con los que comúnmente interactúan los ligandos (quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, kaempferol) para formar puentes de hidrógeno, se

observaron SER342 y GLU291 en el presente estudio, los cuales coinciden con los reportados por otros autores, considerándolos con potencial actividad antiadipogénica y antidiabética sobre el receptor PPAR γ (Aranaz et al., 2019; Encinar et al., 2015; Prabhu & Rajeswari, 2018). Por lo tanto, los residuos de aminoácidos ARG280, HIS266, SER342 y GLU291 pueden ser cruciales en la interacción con el receptor, ya que son con los que forman puentes de hidrógeno e influyen en la afinidad de unión con PPAR γ . En cuanto a la energía de unión mínima de los ligandos para C/EBP β , el ligando que exhibió el valor mínimo de energía fue epicatequina (-4.43 kcal/mol), formando puentes de hidrógeno con los residuos del receptor en GLU336, LYS332, seguido del kaempferol, el cual exhibió una energía de unión de -4.13 kcal/mol, los demás ligandos exhibieron energía de unión similar. El residuo de aminoácido con el que interactuaron la mayoría de los ligandos (catequina, galocatequina, kaempferol y buteina) fue ARG328. Pulugulla et al., (2018) investigaron la interacción proteína-proteína, donde el residuo de aminoácido GLU336 es el sitio a donde el gen SPI1 se une con el receptor C/EBP β . Lo que sugiere que el residuo GLU336 puede estar influyendo en el valor de energía de unión, ya que en el presente estudio la epicatequina fue el ligando que obtuvo el valor más bajo y fue el único que formó puente de hidrógeno con este residuo, por lo que puede ser el responsable de modular la actividad de este factor de transcripción.

Por otro lado, los ligandos epigalocatequina y la epicatequina que se identificaron con potencial actividad antiadipogénica *in silico* han sido reportados por otros autores en diferentes modelos de estudio. Suzuki et al., (2016) observaron que las catequinas son capaces de suprimir la expresión de las proteínas y los genes de C/EBP y PPAR tanto en modelos *in vitro* como las células 3T3-L1 comúnmente utilizada para comprender los mecanismos de la adipogénesis y en modelos *in vivo* como las ratas Sprague Dawley utilizada en el estudio de diferentes enfermedades, entre ellas la obesidad (Li et al., 2018; Wang et al., 2014). Por lo tanto, según los resultados obtenidos en el presente estudio se le puede atribuir el efecto antiadipogénico a estos dos ligandos, ya que fueron los que obtuvieron un mínimo

valor de energía de unión ligando receptor y existe evidencia que en otros modelos de estudio siguen teniendo la misma actividad.

IX. CONCLUSIONES

Las semillas de haba fresca sin digerir presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con respecto a las semillas de haba madura.

Las semillas de haba madura, aun cuando en cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fue menor, presenta una mayor bioaccesibilidad después de la simulación gastrointestinal *in vitro*.

Los compuestos ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, EGC, catequina, EC, quercetina 3- β -D-glucósido y quercetina se encuentran presentes en mayor concentración en las semillas de haba fresca sin digerir.

En la fase bioaccesible los compuestos EGC, catequina, rutina, quercetina y quercetina 3- β -D-glucósido presentaron mayor contenido en las semillas de haba fresca con respecto a la madura.

El análisis *in silico* predijo el efecto antiadipogénico que poseen los flavonoides presentes en semillas de haba maduras y frescas. Donde el ligando galato de epigalocatequina mostró una energía de unión de -9.5 kcal/mol y formó dos puentes de hidrógeno con los residuos ARG280 y HIS266 del factor de transcripción PPAR γ . Y el ligando epicatequina obtuvo un resultado de -4.43 kcal/mol con dos puentes de hidrógeno en los residuos GLU336 y LYS332 del factor de transcripción C/EBP β .

X. LIMITACIONES

La simulación gastrointestinal *in vitro* nos muestra un acercamiento de lo que puede suceder en el organismo, sin embargo, es necesario realizar estas determinaciones en modelos *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos.

El uso de herramientas bioinformáticas es útil para detectar y predecir posibles uniones entre ligando-receptor y la capacidad que tienen los ligandos de modular la actividad de las proteínas, ya que da como resultado una aproximación de lo que podría ocurrir.

REFERENCIAS

- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Warad, I., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017). UHPLC/MS2-based approach for the comprehensive metabolite profiling of bean (*Vicia faba* L.) by-products: A promising source of bioactive constituents. *Food Research International*, 93, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.014>
- Aguilera, C., Labbé, T., Busquets, J., Venegas, P., Neira, C., Valenzuela, Á., Aguilera, C., Labbé, T., Busquets, J., Venegas, P., Neira, C., & Valenzuela, Á. (2019). Obesidad: ¿Factor de riesgo o enfermedad? *Revista médica de Chile*, 147(4), 470-474. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872019000400470>
- Allam, A. E., Nafady, A. M., Nakagawa, T., Takemoto, N., & Shimizu, K. (2018). Effect of polyphenols from *Vicia faba* L on lipase activity and melanogenesis. *Natural Product Research*, 32(16), 1920-1925. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1359169>
- Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2017). Antioxidant activity of broad bean seed extract and its phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, 38, 656-662. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.002>
- Andersen, C., Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2010). Phytochemicals and adipogenesis. *BioFactors*, 36(6), 415-422. <https://doi.org/10.1002/biof.115>
- Angelino, D., Cossu, M., Marti, A., Zanoletti, M., Chiavaroli, L., Brighenti, F., Del Rio, D., & Martini, D. (2017). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. *Food & Function*, 8(7), 2368-2393. <https://doi.org/10.1039/c7fo00574a>
- Aranaz, P., Navarro-Herrera, D., Zabala, M., Miguélez, I., Romo-Hualde, A., López-Yoldi, M., Martínez, J. A., Vizmanos, J. L., Milagro, F. I., & González-Navarro, C. J. (2019). Phenolic Compounds Inhibit 3T3-L1 Adipogenesis Depending on the Stage of Differentiation and Their Binding Affinity to PPAR γ . *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061045>

- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>
- Baek, S. J., Hammock, B. D., Hwang, I.-K., Li, Q., Moustaid-Moussa, N., Park, Y., Safe, S., Suh, N., Yi, S.-S., Zeldin, D. C., Zhong, Q., Bradbury, J. A., Edin, M. L., Graves, J. P., Jung, H.-Y., Jung, Y.-H., Kim, M.-B., Kim, W., Lee, J., ... Han, H.-J. (2021). Natural Products in the Prevention of Metabolic Diseases: Lessons Learned from the 20th KAST Frontier Scientists Workshop. *Nutrients*, 13(6), 1881. <https://doi.org/10.3390/nu13061881>
- Baginsky, C., Peña-Neira, Á., Cáceres, A., Hernández, T., Estrella, I., Morales, H., & Pertuzé, R. (2013). Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.003>
- Barros, R. G. C., Pereira, U. C., Andrade, J. K. S., de Oliveira, C. S., Vasconcelos, S. V., & Narain, N. (2020). In vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. *Food Research International*, 136, 109614. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109614>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (s. f.). *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3*. 176.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Feunteun, S. L., Macierzanka, A., Menard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutelier, V., Wooster, T. J., Lesmes, U., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro

- digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2239-2261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609-615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- Boukhanouf, S., Louaileche, H., & Perrin, D. (2016). *Phytochemical content and in vitro antioxidant activity of faba bean (Vicia faba L.) as affected by maturity stage and cooking practice*. *international food research journal*, 23, 954-961.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Cassidy, A., & Minihane, A.-M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1), 10-22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051>
- Castillo, F., González, D. R., & Moore-Carrasco, R. (2019). Effects of *Phaseolus vulgaris* Extract on Lipolytic Activity and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes: A Strategy to Prevent Obesity. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/5093654>
- Chaieb, N., González, J. L., López-Mesas, M., Bouslama, M., & Valiente, M. (2011). Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba L.*) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International*, 44(4), 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.026>
- Chaieb, N., López-Mesas, M., González, J. L., Mars, M., & Valiente, M. (2015). Hollow fibre liquid phase micro-extraction by facilitated anionic exchange for the determination of flavonoids in faba beans (*Vicia faba L.*): HF-LPME for the analysis of flavonoids in faba beans. *Phytochemical Analysis*, 26(5), 346-352. <https://doi.org/10.1002/pca.2569>

- Chen, P. X., Tang, Y., Marcone, M. F., Pauls, P. K., Zhang, B., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 185, 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.100>
- Chen, X., Xiong, J., He, L., Zhang, Y., Li, X., Zhang, L., & Wang, F. (2018). Effects of In Vitro Digestion on the Content and Biological Activity of Polyphenols from *Acacia mearnsii* Bark. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(7), 1804. <https://doi.org/10.3390/molecules23071804>
- Chung, K. Y., Kim, J., & Johnson, B. J. (2021). All-trans retinoic acid alters the expression of adipogenic genes during the differentiation of bovine intramuscular and subcutaneous adipocytes. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(6), 1397-1410. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e125>
- Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>
- Collado, E., Venzke Klug, T., Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F., Martínez-Sánchez, A., Aguayo, E., Artés, F., Fernández, J. A., & Gómez, P. A. (2019). Nutritional and quality changes of minimally processed faba (*Vicia faba* L.) beans during storage: Effects of domestic microwaving. *Postharvest Biology and Technology*, 151, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.008>
- Damián-Medina, K., Salinas-Moreno, Y., Milenkovic, D., Figueroa-Yáñez, L., Marino-Marmolejo, E., Higuera-Ciapara, I., Vallejo-Cardona, A., & Lugo-Cervantes, E. (2020). In silico analysis of antidiabetic potential of phenolic compounds from blue corn (*Zea mays* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon*, 6(3), e03632. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03632>

- Day, A. J., Can, F. J., Faulds, C. B., Plumb, W., Morgan, M. R. A., & Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 5.
- Duan, S.-C., Kwon, S.-J., & Eom, S.-H. (2021). Effect of Thermal Processing on Color, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Leaves and Seeds. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1207. <https://doi.org/10.3390/antiox10081207>
- Encinar, J. A., Fernández-Ballester, G., Galiano-Ibarra, V., & Micol, V. (2015). In silico approach for the discovery of new PPAR γ modulators among plant-derived polyphenols. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5877-5895. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93449>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. (2019). ENSANUT. Recuperado 30 de noviembre de 2019, de <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2016/informes.php>
- Etcheverry, P., Grusak, M., & Fleige, L. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3, 317. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>
- Etemadi, F., Hashemi, M., Barker, A. V., Zandvakili, O. R., & Liu, X. (2019). Agronomy, Nutritional Value, and Medicinal Application of Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Horticultural Plant Journal*, 5(4), 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.04.004>
- FAOSTAT. (2020). Recuperado 30 de marzo de 2020, de <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- FAOSTAT. (2020). Recuperado 27 de marzo de 2020, de http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
- Feng, X.-Y., Ding, T.-T., Liu, Y.-Y., Xu, W.-R., & Cheng, X.-C. (2021). In-silico identification of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α/γ agonists from Ligand Expo Components database. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 39(5), 1853-1864. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1745279>

- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, *20*(7), 13384-13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Foschia, M., Horstmann, S. W., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2017). Legumes as Functional Ingredients in Gluten-Free Bakery and Pasta Products. *Annual Review of Food Science and Technology*, *8*(1), 75-96. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030045>
- Fu, C., Jiang, Y., Guo, J., & Su, Z. (2016). Natural Products with Anti-obesity Effects and Different Mechanisms of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(51), 9571-9585. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04468>
- Gan, C.-C., Ni, T.-W., Yu, Y., Qin, N., Chen, Y., Jin, M.-N., & Duan, H.-Q. (2017). Flavonoid derivative (Fla-CN) inhibited adipocyte differentiation via activating AMPK and up-regulating microRNA-27 in 3T3-L1 cells. *European Journal of Pharmacology*, *797*, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.009>
- Gao, Y., Yao, Y., Zhu, Y., & Ren, G. (2015). Isoflavones in Chickpeas Inhibit Adipocyte Differentiation and Prevent Insulin Resistance in 3T3-L1 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(44), 9696-9703. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03957>
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., & Sagratini, G. (2017). Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chemistry*, *221*, 689-697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.118>
- Giusti, F., Capuano, E., Sagratini, G., & Pellegrini, N. (2019). A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and in vitro digestion. *Food Chemistry*, *285*, 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.148>
- Göl, Ş., Doğanlar, S., & Frary, A. (2017). Relationship between geographical origin, seed size and genetic diversity in faba bean (*Vicia faba* L.) as revealed by SSR markers. *Molecular Genetics and Genomics*, *292*(5), 991-999. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1326-0>

- Governa, P., Manetti, F., Miraldi, E., & Biagi, M. (2021). Effects of in vitro simulated digestion on the antioxidant activity of different *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves extracts. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03864-1>
- Guo, L., Li, X., & Tang, Q.-Q. (2015). Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) β^* . *Journal of Biological Chemistry*, *290*(2), 755-761. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.619957>
- Guzmán-Ortiz, F. A., San Martín-Martínez, E., Valverde, M. E., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J. D. J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max* L.). *CyTA - Journal of Food*, *15*(4), 516-524. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1302995>
- Herranz-López, M., Fernández-Arroyo, S., Pérez-Sánchez, A., Barraón-Catalán, E., Beltrán-Debón, R., Menéndez, J. A., Alonso-Villaverde, C., Segura-Carretero, A., Joven, J., & Micol, V. (2012). Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine*, *19*(3-4), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.001>
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2014). Bioaccessibility of polyphenols from wheat (*Triticum aestivum*), sorghum (*Sorghum bicolor*), green gram (*Vigna radiata*), and chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by domestic food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(46), 11170-11179. <https://doi.org/10.1021/jf503450u>
- Hu, M., Wu, B., & Liu, Z. (2017). Bioavailability of Polyphenols and Flavonoids in the Era of Precision Medicine. *Molecular Pharmaceutics*, *14*(9), 2861-2863. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00545>
- Jacob, R. B., Andersen, T., & McDougal, O. M. (2012). Accessible High-Throughput Virtual Screening Molecular Docking Software for Students and Educators. *PLoS Computational Biology*, *8*(5), e1002499. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002499>

- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
- Javaloyes, P., O'Broin, S., & Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació. (2016). *Legumbres semillas nutritivas para un futuro sostenible*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Jiang, Y., Ding, S., Li, F., Zhang, C., Sun-Waterhouse, D., Chen, Y., & Li, D. (2019). Effects of (+)-catechin on the differentiation and lipid metabolism of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*, 62, 103558. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103558>
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 530-534. <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>
- Jordán-Aguilar, B., Díaz-Ruiz, R., Ocampo-Fletes, I., Jacinto-Hernández, C., Escalante-Estrada, J. A. S., & Pérez-Ramírez, E. (2019). Características relacionadas con el consumo de haba consideradas por las amas de casa de la región productora de Puebla y Tlaxcala, México. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 29(54). <https://doi.org/10.24836/es.v29i54.761>
- Kamiloglu, S., & Capanoglu, E. (2014). In vitro gastrointestinal digestion of polyphenols from different molasses (pekmez) and leather (pestil) varieties. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(4), 1027-1039. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12396>
- Khalid, M., Saeed-ur-Rahman, Bilal, M., & Huang, D. (2019). Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens—A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1), 211-230. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62555-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4)

- Klepac, K., Georgiadi, A., Tschöp, M., & Herzig, S. (2019). The role of brown and beige adipose tissue in glycaemic control. *Molecular Aspects of Medicine*, 68, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.07.001>
- Kostikova, V. A., & Veklich, T. N. (2020). HPLC analysis of phenolic compounds in leaves and inflorescences of *Sorbaria pallasii*. *BIO Web of Conferences*, 24, 00040. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400040>
- Kumar, A., Nidhi, Prasad, N., & Sinha, S. K. (2015). Nutritional and antinutritional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) germplasms growing in Bihar, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(1), 159-162. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0270-2>
- Kumkarnjana, S., Suttisri, R., Nimmannit, U., Koobkokkrud, T., Pattamadilok, C., & Vardhanabhuti, N. (2018). Anti-adipogenic effect of flavonoids from *Chromolaena odorata* leaves in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Integrative Medicine*, 16(6), 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.10.002>
- Kuri-Harcuch, W., Velez-delValle, C., Vazquez-Sandoval, A., Hernández-Mosqueira, C., & Fernandez-Sanchez, V. (2019). A cellular perspective of adipogenesis transcriptional regulation. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1111-1129. <https://doi.org/10.1002/jcp.27060>
- Kwon, S.-J., Kim, D.-G., Kim, J. M., Kang, K.-Y., Lee, M.-K., Hong, M. J., Kim, J.-B., Eom, S. H., Kang, S.-Y., Ha, B.-K., & Ryu, and J. (2018). Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity in the Grain of Selected Faba Bean (*Vicia faba*) Genotypes. *Plant Breeding and Biotechnology*, 6(1), 65-73. <https://doi.org/10.9787/PBB.2018.6.1.65>
- Lafarga, T., Villaró, S., Bobo, G., Simó, J., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in cooked pulses. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1816-1823. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14082>
- Lamiquiz-Moneo, I., Mateo-Gallego, R., Bea, A. M., Dehesa-García, B., Pérez-Calahorra, S., Marco-Benedí, V., Baila-Rueda, L., Laclaustra, M., Civeira, F., & Cenarro, A. (2019). Genetic predictors of weight loss in overweight and

- obese subjects. *Scientific Reports*, 9(1), 10770.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47283-5>
- Lee, J.-E., Cho, Y.-W., Deng, C.-X., & Ge, K. (2020). MLL3/MLL4-Associated PAGR1 Regulates Adipogenesis by Controlling Induction of C/EBP β and C/EBP δ . *Molecular and Cellular Biology*, 40(17), e00209-20.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00209-20>
- Lee, J.-E., Schmidt, H., Lai, B., & Ge, K. (2019). Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 39(11), e00601-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00601-18>
- Li, F., Gao, C., Yan, P., Zhang, M., Wang, Y., Hu, Y., Wu, X., Wang, X., & Sheng, J. (2018). EGCG Reduces Obesity and White Adipose Tissue Gain Partly Through AMPK Activation in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1366.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01366>
- Liu, F., Kariluoto, S., Edelmann, M., & Piironen, V. (2021). Bioaccessibility of folate in faba bean, oat, rye and wheat matrices. *Food Chemistry*, 350, 129259.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129259>
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during in vitro gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*, 2015, e905215.
<https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical

- implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 502-513.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
- Moreno-Valdespino, C. A., Luna-Vital, D., Camacho-Ruiz, R. M., & Mojica, L. (2020). Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: Mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 130, 108905. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108905>
- Mota de Sá, P., Richard, A. J., Hang, H., & Stephens, J. M. (2017). Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 635-674.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160022>
- Mtolo, M., Gerrano, A., & Mellem, J. (2017). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *CyTA - Journal of Food*, 15(3), 391-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1285816>
- Murota, K., Nakamura, Y., & Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(4), 600-610.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>
- Naamane, N., van Helden, J., & Eizirik, D. L. (2007). In silico identification of NF-kappaB-regulated genes in pancreatic beta-cells. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-55>
- Nerlov, C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: A paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends in Cell Biology*, 17(7), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.004>
- Obesidad y sobrepeso*. (2019). Recuperado 30 de noviembre de 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Ohoka, N., Kato, S., Takahashi, Y., Hayashi, H., & Sato, R. (2009). The Orphan Nuclear Receptor ROR α Restrains Adipocyte Differentiation through a Reduction of C/EBP β Activity and Perilipin Gene Expression. *Molecular Endocrinology*, 23(6), 759-771. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0277>
- OMS | 10 datos sobre la obesidad. (2019). Recuperado 30 de noviembre de 2019, de <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>

- Peanparkdee, M., Patrawart, J., & Iwamoto, S. (2020). Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and anthocyanins from Thai rice bran extracts. *Food Chemistry*, 329, 127157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127157>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Prabhu, D. S., & Rajeswari, V. D. (2018). In vitro and in silico analyses of *Vicia faba* L. on Peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7729-7737. <https://doi.org/10.1002/jcb.27123>
- Prabhu, D. S., & Rajeswari, V. D. (2020). PPAR-Gamma as putative gene target involved in Butein mediated anti-diabetic effect. *Molecular Biology Reports*, 47(7), 5273-5283. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05605-1>
- Prabhu, S., & Rajeswari, D. (2018). *Nutritional and Biological properties of Vicia faba L.: A perspective review*. 9. <https://doi.org/10.1002/jcb.27123>
- Puhl, A. C., Bernardes, A., Silveira, R. L., Yuan, J., Campos, J. L. O., Saidemberg, D. M., Palma, M. S., Cvorov, A., Ayers, S. D., Webb, P., Reinach, P. S., Skaf, M. S., & Polikarpov, I. (2012). Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. *Molecular Pharmacology*, 81(6), 788-799. <https://doi.org/10.1124/mol.111.076216>
- Pulugulla, S. H., Workman, R., Rutter, N. W., Yang, Z., Adamik, J., Lupish, B., Macar, D. A., El Abdouni, S., Esposito, E. X., Galson, D. L., Camacho, C. J., Madura, J. D., & Auron, P. E. (2018). A combined computational and experimental approach reveals the structure of a C/EBP β -Spi1 interaction required for IL1B gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(52), 19942-19956. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005627>
- Rebaa, F., Abid, G., Aouida, M., Abdelkarim, S., Aroua, I., Muhovski, Y., Baudoin, J.-P., M'hamdi, M., Sassi, K., & Jebara, M. (2017). Genetic variability in Tunisian populations of faba bean (*Vicia faba* L. var. Major) assessed by morphological and SSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 397-409. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0419-x>

- Rui, W., Jin, Z., Zhe, G., & Song, H. (2013). The methylation of C/EBP β gene promoter and regulated by GATA-2 protein. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 797-801. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2117-7>
- Ruiz-Ojeda, F., Rupérez, A., Gomez-Llorente, C., Gil, A., & Aguilera, C. (2016). Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1040. <https://doi.org/10.3390/ijms17071040>
- Salehi, B., Abu-Reidah, I. M., Sharopov, F., Karazhan, N., Sharifi-Rad, J., Akram, M., Daniyal, M., Khan, F. S., Abbaass, W., Zainab, R., Carbone, K., Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., Lucarini, M., Durazzo, A., Santini, A., Martorell, M., & Pezzani, R. (2021). Vicia plants—A comprehensive review on chemical composition and phytopharmacology. *Phytotherapy Research*, 35(2), 790-809. <https://doi.org/10.1002/ptr.6863>
- Salem Al-Nbaheen, M. (2020). Impact of weight loss predictors in severe-morbid obesity patients in the Saudi population. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.015>
- Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a008417-a008417. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>
- Sauer, S. (2015). Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(10), 688-704. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.06.010>
- Schwarz, E. J., Reginato, M. J., Shao, D., Krakow, S. L., & Lazar, M. A. (1997). Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP β -mediated transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1552-1561.
- Siah, S., Konczak, I., Wood, J. A., Agboola, S., & Blanchard, C. L. (2014). Effects of Roasting on Phenolic Composition and In vitro Antioxidant Capacity of Australian Grown Faba Beans (*Vicia faba* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), 85-91. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0400-y>
- Šibul, F., Orčić, D., Vasić, M., Anačkov, G., Nađpal, J., Savić, A., & Mimica-Dukić, N. (2016). Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb

- and root extracts of seven selected legumes. *Industrial Crops and Products*, 83, 641-653. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.057>
- Siersbæk, R., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2010). PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*, 584(15), 3242-3249. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.010>
- Silva, C. P., Sampaio, G. R., Freitas, R. a. M. S., & Torres, E. a. F. S. (2018). Polyphenols from guaraná after in vitro digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Food Chemistry*, 267, 405-409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.078>
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.026>
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40-56. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>
- Suzuki, T., Pervin, M., Goto, S., Isemura, M., & Nakamura, Y. (2016). Beneficial Effects of Tea and the Green Tea Catechin Epigallocatechin-3-gallate on Obesity. *Molecules*, 21(10), 1305. <https://doi.org/10.3390/molecules21101305>
- T, M. M., T, A., P, B. K., Fathima, A., & Khanum, F. (2020). In-silico therapeutic investigations of arjunic acid and arjungenin as an FXR agonist and validation in 3T3-L1 adipocytes. *Computational Biology and Chemistry*, 84, 107163. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107163>
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Soszka, A. (2020). Changes in Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruit Musts and Fruit Wines during Simulated Digestion. *Molecules*, 25(23), 5574. <https://doi.org/10.3390/molecules25235574>
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 64(2), 79-84.

- Taylor, J. (2020). Looking Beyond Lifestyle: A Comprehensive Approach to the Treatment of Obesity in the Primary Care Setting. *The Journal for Nurse Practitioners*, 16(1), 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.09.021>
- Turco, I., Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2016). Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *J. Food Nutr. Res.*, 55, 11.
- Vioque, J., Alaiz, M., & Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, 132(1), 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033>
- Walocko, F. M., Eber, A. E., Kirsner, R. S., Badiavas, E., & Nouri, K. (2018). Systematic review of the therapeutic roles of adipose tissue in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(5), 935-944. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.06.010>
- Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2003). HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chemistry*, 81(2), 307-312. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00510-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00510-1)
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., Blazevic, T., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Heiss, E. H., Schuster, D., Kopp, B., Bauer, R., Stuppner, H., Dirsch, V. M., & Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 73-89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>
- Wang, Q., Wang, S., Yang, X., You, P., & Zhang, W. (2015). Myricetin suppresses differentiation of 3 T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes. *Nutrition Research*, 35(4), 317-327. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.12.009>
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., & Shen, C.-L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>

- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Xue, P., Hou, Y., Zuo, Z., Wang, Z., Ren, S., Dong, J., Fu, J., Wang, H., Andersen, M. E., Zhang, Q., Xu, Y., & Pi, J. (2020). Long isoforms of NRF1 negatively regulate adipogenesis via suppression of PPAR γ expression. *Redox Biology*, 30, 101414. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101414>
- Yu, Y., Zhang, B., Xia, Y., Li, H., Shi, X., Wang, J., & Deng, Z. (2019). Bioaccessibility and transformation pathways of phenolic compounds in processed mulberry (*Morus alba* L.) leaves after in vitro gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 60, 103406. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.06.008>
- Zhu, L., Li, W., Deng, Z., Li, H., & Zhang, B. (2020). The Composition and Antioxidant Activity of Bound Phenolics in Three Legumes, and Their Metabolism and Bioaccessibility of Gastrointestinal Tract. *Foods*, 9(12), 1816. <https://doi.org/10.3390/foods9121816>