



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

APROVECHAMIENTO DE LA PLANTA DE HABA (*Vicia faba* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

PAULA BEATRIZ FUENTES HERRERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2021

La presente tesis, titulada: **Aprovechamiento de la planta de haba (*Vicia faba L.*) para la obtención de compuestos bioactivos**, realizada por la alumna: **Paula Beatriz Fuentes Herrera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

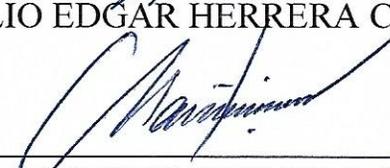
CONSEJERA:


DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:


DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

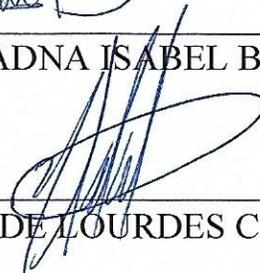
ASESOR:


DR. MARIO ALBERTO TORNERO CAMPANTE

ASESORA:


DRA. ARIADNA ISABEL BARRERA RODRÍGUEZ

ASESORA:


DRA. MA. DE LOURDES C. ARÉVALO GALARZA

ASESORA:


DRA. ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA

Puebla, Puebla, México, 26 de marzo del 2021

APROVECHAMIENTO DE LA PLANTA DE HABA (*Vicia faba* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Paula Beatriz Fuentes Herrera, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

La planta de *Vicia faba* puede ser aprovechada para la obtención de compuestos bioactivos (CB) para prevenir y/o tratar enfermedades. En México, la producción y el consumo de haba son bajos, así que para incrementarlos se propone incorporar una innovación tecnológica. El objetivo fue conocer, cuantificar y obtener los rendimientos de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-DOPA (L-3,4-dihidroxi-fenilalanina) y daidzeína, en plantas de haba de variedades mexicanas, y evaluar la influencia que tienen la condición de crecimiento, las variables agroambientales y los métodos de secado en el contenido de estos CB. Además, se estimó la rentabilidad de una innovación tecnológica para el cultivo de haba. El cultivar Calvario y las variedades de haba Rojita, ICAMEX-V31, José María y Matlatzintla, se sembraron en campo e invernadero. De ambas condiciones se cosecharon plantas de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE), y en la floración los botones florales y flores abiertas. Los tejidos se procesaron por liofilización (-80 °C) y/o por estufa (38 °C), se molieron para su extracción y posterior análisis por espectrofotometría UV-visible y HPLC. Las actividades antioxidante (DPPH) y antiinflamatoria se evaluaron *in vitro*. Para el análisis de rentabilidad, se evaluaron los costos, ingresos y ganancias de la producción de haba y de la planta. Los resultados tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$) entre las variedades, condiciones de crecimiento y métodos de procesamiento. Las plantas de 10 DDE tuvieron los contenidos más altos de CFT, FT, L-DOPA y las de 20 DDE los de daidzeína. Las flores mostraron el mayor contenido de todos los CB. En campo se tuvieron los contenidos más altos de CB en comparación con invernadero. El secado en estufa conservo mejor a los CFT y FT de las plantas en condición de campo, pero en invernadero se conservaron mayormente con liofilizado. La variedad Rojita mostro mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria, que se atribuyen a L-DOPA y a rutina e isoorientinas, respectivamente. La variedad José María mostró la mayor acumulación de CB por área. La ganancia promedio que perciben los productores por la venta al mayoreo de haba verde fue de US \$ 522.79. Con el cultivo de plantas de 20 DDE la ganancia podría aumentar 104, 53 y 35% en ¼, ½ y 1 ha respectivamente, en relación con la venta a mayoreo de haba verde. La innovación tecnológica es una alternativa para mejorar los ingresos de las familias productoras de haba.

Palabras clave: Actividad antiinflamatoria, campo, flavonoides, L-DOPA, innovación tecnológica, invernadero, rendimiento, rentabilidad.

USE OF THE BROAD BEAN PLANT (*Vicia faba* L.) TO OBTAINING BIOACTIVE COMPOUNDS

Paula Beatriz Fuentes Herrera, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

Vicia faba plant can be used to obtain bioactive compounds (BC) to prevent and / or treat diseases. In Mexico, broad bean production and consumption are low, so to increase them, it is proposed to incorporate a technological innovation. The aim was to know, quantify and obtain the yield of total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF), L-DOPA (3,4-dihydroxy- phenyl-L-alanine) and daidzein, in broad bean plants of Mexican varieties, and to evaluate the influence of the growth condition, the agri-environmental variables and drying methods in the content of these BC. In addition, the profitability of a technological innovation for the cultivation of broad beans was estimated. The cultivar Calvario and broad bean varieties Rojita, ICAMEX-V31, José María and Matlatzintla were sown in field and greenhouse conditions. Plants were harvested in different stage of development [10, 15 and 20 days after emergence (DAE)], and floral buds and open flowers were obtained in the flowering period. The tissues were processed by freeze-drying (-80 °C) and /or by oven-drying (38 °C), they were ground for extraction and subsequent analysis by UV-visible spectrophotometry and by HPLC. Antioxidant (DPPH) and anti-inflammatory activities were also evaluated *in vitro*. For the profitability analysis, were evaluated the costs, income and profits of the green broad bean production and of the plant. The results presented significant differences in varieties, growing conditions and processing methods. The 10 DAE plants presented the highest content of TPC, TF, L-DOPA and the 20 DAE plants of daidzein. Flowers showed the highest content of all CB. The field-grown plants presented higher BC contents compared to those from greenhouse-grown plants. The field-grown plants conserved the TPC and FT better with oven-dried samples, but greenhouse-grown plants conserved them mainly with freeze-dried samples. Rojita variety showed greater antioxidant and anti-inflammatory activity, which are attributed to L-DOPA and rutin and isoorientins, respectively. José María variety showed the highest accumulation of BC per area. The average profit received by producers from the wholesale sale of green beans was US \$ 522.79. With the cultivation of 20 DAE plants, profit could increase 104, 53 and 35% in ¼, ½ and 1 ha respectively, in relation to the wholesale sale of green broad beans. Technological innovation is an alternative to improve the income of fava bean-producing families.

Keywords: Anti-inflammatory activity, field, flavonoids, greenhouse, L-DOPA, yield, technological innovation.

DEDICATORIA

*Para mi hijo Eder Paul y mi esposo Edgar por la paciencia, la comprensión,
el cariño y apoyo que siempre me brindaron. Este logro es de los tres.*

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por seguir becando mis estudios de Doctorado.



Al **Colegio de Postgraduados Campus Puebla** por la formación académica a través del Posgrado de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.



A todo mi consejo particular:

Principalmente a mi consejera la **Dra. Adriana Delgado Alvarado** por el apoyo, dedicación y compromiso que tuvo conmigo en la investigación. Por la exigencia que siempre mostró con el trabajo en laboratorio, en campo, en las exposiciones, en los escritos y en las distintas participaciones. Por enseñarme a ser profesional y comprometida con el trabajo. Por estos siete años de trabajo juntas, por la confianza y amistad que se generó.

Al **Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera** por sus conocimientos y el apoyo que me brindó en la parte estadística, por sus puntuales observaciones, por compartirme consejos y motivarme a continuar superándome, principalmente por la amistad y su confianza.

A la **Dra. Alma Leticia Martínez Ayala** por el gran apoyo brindado en la utilización de equipos, estándares y la vinculación con otros centros de investigación. Por sus observaciones puntuales, por su calidad como persona, exigencia y amistad.

Al **Dr. Mario Alberto Tornero Campante** por su gran apoyo en campo e invernadero, por su exigencia como asesor, por sus consejos y comentarios acertados en la investigación, por hacerme hincapié de la importancia del aspecto social, y por la confianza y amistad que se generó.

A la **Dra. Ma. de Lourdes Arévalo Galarza** por sus puntuales observaciones, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por el apoyo que me brindó en la utilización del equipo HPLC, por la amistad y confianza que se generó.

A la **Dra. Ariadna Isabel Barrera Rodríguez**, por compartirme sus conocimientos en el área socio-económica, por guiarme y dejarme experimentar en la investigación. Además, por su calidad como persona, por la confianza que me genera y por su gran amistad.

Al **Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX)** por donarnos las variedades de haba utilizadas en la investigación.



Al **Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada** por haberme permitido realizar el análisis de L-DOPA con el equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC). Principalmente el agradecimiento es para la **Dra. Alma Leticia Martínez Ayala** y la **M.C. Ada María Ríos Cortés**.



Al **Colegio de Postgraduados campus Montecillos**, principalmente al área de Postcoscha del Postgrado de Fruticultura, por haberme permitido realizar el análisis de daidzeína con el equipo HPLC. Principalmente el agradecimiento es para la **Dra. Ma. de Lourdes Arévalo Galarza** y a la **M.C. Cecilia García Osorio**.



Al **Centro de Investigación Biomédica del Sur- IMSS** por haberme permitido realizar los análisis de L-DOPA, Rutina e Isoorientinas con el equipo HPLC. El agradecimiento principalmente es para el **Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez** y a la **BIO. Ixchel Gómez Palacios**.



A los **productores de haba** que me dieron su confianza y apoyo para realizar parte de la investigación.

Al **Ing. Víctor Lavara Barragán**, la **IBT. María Fernanda Coba Avelino** y **BIO. Saraí Gómez Toxqui** por la ayuda que me brindaron con el procesamiento de las muestras y parte de la realización de algunos análisis.

A mis compañeros de laboratorio **I.A. Zayra Pérez Orozco**, **M.C. Lupita Andrade Andrade**, **M.C. Cecilia Viveros Antocio**, y **M.C. Mónica Lima Morales**, por la convivencia y amistad que generamos en el laboratorio.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP

Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”

LISTA DE CUADROS

| | | Página |
|-------------------|---|---------------|
| Cuadro 1.1 | Estándares y longitud de onda utilizados para cuantificar Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y Flavonoides Totales (FT) por espectrofotometría UV - Visible. | 19 |
| Cuadro 1.2 | Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) de los solventes de extracción de compuestos fenólicos. | 23 |
| Cuadro 1.3 | Análisis de varianza de compuestos bioactivos en plantas de <i>Vicia faba</i> L. sembradas en condiciones de campo e invernadero. | 24 |
| Cuadro 1.4 | Análisis de varianza de compuestos bioactivos en las flores de <i>Vicia faba</i> L. sembradas en condiciones de crecimiento diferentes. | 25 |
| Cuadro 1.5 | Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) por método de procesamiento de compuestos bioactivos en plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 28 |
| Cuadro 2.1 | Citas de investigaciones en <i>Vicia faba</i> L. y <i>Glicine Max</i> relacionadas con factores que influyen en los contenidos de los compuestos bioactivos (CB). | 49 |
| Cuadro 2.2 | Características de las semillas de haba utilizadas en la investigación. | 50 |
| Cuadro 2.3 | Medias generales de las variables agroambientales en tres intervalos de tiempo en el día (6:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm), durante el crecimiento de las plantas de <i>Vicia faba</i> L. a los 10,15 y 20 días después de la emergencia (DDE). | 55 |
| Cuadro 2.4 | Análisis de varianza de contenidos de compuestos bioactivos en plantas de haba de 10, 15 y 20 DDE sembradas en condiciones de campo e invernadero. | 62 |
| Cuadro 2.5 | Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) de contenidos de compuestos bioactivos en plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 63 |
| Cuadro 2.6 | Análisis de varianza del contenido de compuestos bioactivos en flores de haba sembradas en condiciones de campo. | 73 |
| Cuadro 2.7 | Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) de contenidos de compuestos bioactivos en flores de <i>Vicia faba</i> L. | 75 |
| Cuadro 2.8 | Análisis de correlaciones canónicas que relaciona variables agroambientales y de suelo con compuestos bioactivos encontrados en plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 78 |
| Cuadro 2.9 | Índices de redundancia para la primera y segunda función canónica. | 78 |
| Cuadro 3.1 | Contenido nutricional y posibles beneficios de las leguminosas. | 88 |
| Cuadro 3.2 | Matriz de análisis de política. Rentabilidad Privada. | 96 |
| Cuadro 3.3 | Características de los cultivares de haba que siembran en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio | 97 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| | Zacapechpan, municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. | |
| Cuadro 3.4 | Labores, herramientas y maquinaria utilizada en el cultivo de haba en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan pertenecientes al municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. | 100 |
| Cuadro 3.5 | Ganancias económicas de la producción de haba verde por superficie y modalidad de venta. | 104 |
| Cuadro 3.6 | Labores propuestas por los productores para el cultivo de la planta de <i>Vicia faba</i> L. de veinte días después de la emergencia. | 107 |
| Cuadro 3.7 | Ganancias económicas de la producción de planta de haba por superficie cultivada. | 108 |
| Cuadro 3.8 | Ganancias económicas de la producción de planta de haba en invernadero. | 110 |
| Cuadro 3.9 | Productos a base de <i>Mucuna pruriens</i> como fuente natural de L-DOPA. | 113 |
| Cuadro 4.1 | Medias generales de las variables agroambientales en los intervalos de tiempo de 6:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm en el día, durante el crecimiento de las plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 128 |
| Cuadro 4.2 | Gradiente para la utilización de las fases móviles. | 136 |
| Cuadro 4.3 | Análisis de varianza de compuestos bioactivos en plantas de variedades de <i>Vicia faba</i> L. de 20 días después de la emergencia. | 139 |
| Cuadro 4.4 | Coefficiente de correlación de Pearson de compuestos bioactivos y actividad biofuncional de plantas de variedades de haba de <i>Vicia faba</i> L. de 20 DDE. | 145 |
| Cuadro 4.5 | Biomasa y rendimiento de compuestos bioactivos por planta, por kilogramo y por metro cuadrado de cuatro variedades de haba. | 147 |
| Cuadro 4.6 | Rendimiento de la extracción con metanol de tejido de plantas de <i>Vicia faba</i> . | 148 |
| Cuadro 4.7 | Análisis de varianza de compuestos fenólicos en extracto metanólico de planta de haba. | 148 |
| Cuadro 5.1 | Requerimientos de dosis de L-DOPA en pacientes con Parkinson. | 160 |
| Cuadro 5.2 | Compuestos bioactivos (CB) presentes en tejidos de la planta de <i>Vicia faba</i> . | 164 |
| Cuadro 5.3 | Valores medios de peso en materia seca y rendimientos de compuestos bioactivos de tejidos de haba obtenidos en condiciones de crecimiento de campo. | 165 |
| Cuadro 5.4 | Rangos del contenido de L-DOPA encontrados en tejidos de la planta de haba. | 167 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|--------------------|--|---------------|
| Figura 1.1 | A) Productor de haba de la comunidad de San Agustín Calvario municipio de San Pedro Cholula, Puebla, y B) características morfológicas del cultivar C-Calvario. | 16 |
| Figura 1.2 | Plantas de <i>Vicia faba</i> L. desarrollado bajo distintas condiciones de crecimiento. | 18 |
| Figura 1.3 | Diagrama del proceso para cuantificar Compuestos fenólicos totales (CFT) y Flavonoides totales (FT). | 21 |
| Figura 1.4 | Espectros de absorción de los estándares (···) y muestra (—) (planta de 10 días después de emergencia (DDE) sembrada en campo), después de los ensayos de: A) compuestos fenólicos totales (CFT) y B) flavonoides totales (FT). | 22 |
| Figura 1.5 | Compuestos fenólicos totales (A-C) y flavonoides totales (D-F) en plantas de <i>Vicia faba</i> L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) bajo diferentes condiciones de crecimiento: campo, invernadero-suelo (SUE) e invernadero-tezontle (TEZ) y métodos de procesamiento: liofilizado (L) y estufa (E). | 30 |
| Figura 1.6 | Compuestos fenólicos totales (A y B) y flavonoides totales (C y D) en brotes florales (BF) y flores abiertas (FA) de <i>Vicia faba</i> L. bajo diferentes condiciones de crecimiento: campo, invernadero-suelo (SUE) e invernadero-tezontle (TEZ) y métodos de procesamiento: liofilizado (L) y estufa (E). | 33 |
| Figura 1.7 | Contenido de Compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de <i>Vicia faba</i> L. de diferentes días de emergencia (DDE), bajo condiciones distintas de crecimiento; campo e invernadero, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). | 35 |
| Figura 1.8 | Contenido de Compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de <i>Vicia faba</i> L. de diferentes días de emergencia (DDE), en condiciones distintas de crecimiento; invernadero-suelo e invernadero-tezontle, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). | 36 |
| Figura 1.9 | Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de <i>Vicia faba</i> L.; brotes florales (BF) y flores abiertas (FA), bajo condiciones distintas de crecimiento; campo e invernadero y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). | 37 |
| Figura 1.10 | Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de <i>Vicia faba</i> L.; brotes florales (BF) y flores abiertas (FA), en condiciones distintas de crecimiento; invernadero-suelo e invernadero-tezontle, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). | 38 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 2.1 | Siembra en campo e invernadero de variedades de haba mexicanas. | 51 |
| Figura 2.2 | Diagrama del procesamiento realizado con el material vegetal para sus posteriores determinaciones. | 52 |
| Figura 2.3 | Medias de las variables agroambientales en tres intervalos de tiempo en el día (7:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm) en la condición de campo (izquierda) e invernadero (derecha), durante el crecimiento de las plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 54 |
| Figura 2.4 | Proceso de extracción de L-DOPA de tejidos de haba (<i>Vicia faba</i> L.). | 57 |
| Figura 2.5 | Cromatograma (a) y curva de calibración (b) del estándar de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). | 58 |
| Figura 2.6 | Proceso de extracción de las isoflavonas. | 59 |
| Figura 2.7 | Cromatograma (a) y curva de calibración del estándar de daidzeína (b). | 60 |
| Figura 2.8 | Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). | 64 |
| Figura 2.9 | Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, $n = 27$) y contenido de L-DOPA ($n = 3$) en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). | 65 |
| Figura 2.10 | Contenido de L 3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA) en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). | 66 |
| Figura 2.11 | Biomasa de plantas de <i>Vicia faba</i> L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y cantidad de L3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA) por planta, de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). | 68 |
| Figura 2.12 | Contenido de flavonoides totales en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento. | 69 |
| Figura 2.13 | Contenido de flavonoides totales (FT, $n = 27$) y contenido de Daidzeína (DAID, $n = 3$) en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento. | 70 |
| Figura 2.14 | Contenido de daidzeína en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento. | 71 |
| Figura 2.15 | Biomasa de plantas de <i>Vicia faba</i> L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y cantidad de daidzeína por planta, de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). | 72 |
| Figura 2.16 | Concentración (A) y cantidad (B) de compuestos bioactivos (CB) en flores de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. sembradas en campo. T; plantas tardías, P; plantas precoces, | 76 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| | CFT; Compuestos fenólicos totales (determinados en mg de equivalente de ácido gálico (EAG) g ⁻¹ MS), FT; Flavonoides totales (determinados en mg de equivalente de quercetina (EQ) g ⁻¹ MS); L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 3$). | |
| Figura 2.17 | Representación gráfica de los valores teóricos de las cargas cruzadas canónicas de las dos primeras funciones en la interacción de variables agroambientales y de suelo y compuestos bioactivos de las plantas de <i>Vicia faba</i> L. | 80 |
| Figura 3.1 | Valores medios de producción de haba verde por superficie cultivada en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan, municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. | 101 |
| Figura 3.2 | Síntesis de costos de producción de haba verde por categoría de productor. | 103 |
| Figura 4.1 | Siembra de <i>Vicia faba</i> L. a mayor densidad; a) productor de haba cuadrando el terreno, b) vista frontal del encuadre del suelo a una distancia de 20 cm entre matas (2 semillas por mata), c) vista lateral de las parcelas, d) vista frontal de las parcelas. | 124 |
| Figura 4.2 | VARIABLES agroambientales registradas en campo durante el desarrollo de plantas de <i>Vicia faba</i> L. a los 20 días después de la emergencia. | 126 |
| Figura 4.3 | Medias de las variables agroambientales registradas en campo en tres intervalos de tiempo en el día (7:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm), durante el periodo de crecimiento de las plantas de <i>Vicia faba</i> L. a los 20 días después de la emergencia. | 127 |
| Figura 4.4 | Procedimiento de la extracción de L-DOPA en <i>Vicia faba</i> L. | 129 |
| Figura 4.5 | Determinación de L-DOPA por espectrofotometría UV-visible en microplaca, a) reactivos y coloración de la reacción para la determinación de L-DOPA, b) espectro de absorción de 200 – 600 nm, c) curva de calibración. | |
| Figura 4.6 | Actividad antioxidante por el método de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; a) imagen de la coloración de la reacción, b) obtención del CI ₅₀ de la variedad José María. | 132 |
| Figura 4.7 | Procedimiento de la extracción para la determinación de la actividad anti-inflamatoria. | 133 |
| Figura 4.8 | Actividad anti-inflamatoria de extractos de tejidos de planta de haba a distintas concentraciones (12.5 – 200 mg mL ⁻¹). | 134 |
| Figura 4.9 | Efecto del diclofenaco sódico en la inhibición de la turbidez a distintas concentraciones (25 – 1000 μ g mL ⁻¹). | 135 |
| Figura 4.10 | Cromatograma del extracto metanólico de planta de <i>Vicia faba</i> , a) L-DOPA (pico 1) a 280 nm, b) rutina (pico 1) e isoorientinas (pico 2 y 3) a 350 nm. | 137 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 4.11 | Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y L-DOPA en plantas de variedades de haba. | 140 |
| Figura 4.12 | Actividad antioxidante reportada como porcentaje de inhibición (% I) de los extractos de la planta de variedades de <i>Vicia faba</i> L. de 20 días después de la emergencia. | 142 |
| Figura 4.13 | Actividad anti-inflamatoria de extractos de planta de variedades de haba, a) Porcentaje de inhibición de 12.5 a 200 mg mL ⁻¹ , b) Porcentaje de inhibición de la actividad anti-inflamatoria a 150 mg mL ⁻¹ . | 144 |
| Figura 4.14 | Contenido de rutina, isoorientinas y L-DOPA, en plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. | 149 |
| Figura 4.15 | Estructuras moleculares de rutina (a), isoorientina (b) y L-DOPA (c) (Soares <i>et al.</i> , 2014; Gullón <i>et al.</i> , 2017; Ziqubu <i>et al.</i> , 2020). | 150 |
| Figura 5.1 | Metabolitos derivados de daidzeína con actividad farmacológica. | 163 |
| Figura 5.2 | Cantidades de producción de haba común y haba caballar secas por país en el periodo de 2000-2017 (FAOSTAT, 2019). | 168 |
| Figura 5.3 | Media del Contenido y rendimiento de compuestos bioactivos encontrados en las plantas de cuatro variedades de <i>Vicia faba</i> L. que pueden ser aprovechados e utilizados por su efecto beneficioso en la salud. | 169 |

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 3 |
| HIPÓTESIS | 5 |
| Hipótesis general | 5 |
| Hipótesis particulares..... | 5 |
| OBJETIVOS | 6 |
| Objetivo general | 6 |
| Objetivos específicos..... | 6 |
| LITERATURA CITADA..... | 7 |
| CAPÍTULO I: ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS Y FLORES DE HABA (<i>Vicia faba</i> L.) BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MÉTODOS DE PROCESAMIENTO..... | 12 |
| Resumen | 12 |
| Abstract..... | 13 |
| 1.1 Introducción | 14 |
| 1.2 Materiales y métodos..... | 16 |
| 1.3 Resultados y discusión | 21 |
| 1.4 Conclusiones..... | 39 |
| 1.5 Literatura citada | 40 |
| CAPÍTULO II: CONTENIDO, CANTIDAD Y APROVECHAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PLANTAS Y FLORES DE HABA (<i>Vicia faba</i> L.) BAJO CONDICIONES DISTINTAS DE CRECIMIENTO | 44 |
| Resumen | 44 |
| Abstract..... | 45 |
| 2.1 Introducción | 46 |
| 2.2 Materiales y métodos..... | 49 |
| 2.3 Resultados y discusión | 60 |
| 2.4 Conclusiones..... | 81 |
| 2.5 Literatura citada | 81 |
| CAPÍTULO III: EVALUACIÓN ECONÓMICA DE UNA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA PARA EL CULTIVO DE HABA..... | 85 |
| Resumen | 85 |
| Abstract..... | 86 |

| | |
|---|-----|
| 3.1 Introducción | 86 |
| 3.2 Metodología | 93 |
| 3.3 Resultados y Discusión..... | 96 |
| 3.4 Conclusiones | 114 |
| 3.5 Literatura Citada..... | 114 |
| CAPITULO IV: L-DOPA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PLANTAS DE <i>Vicia faba</i> L.: | |
| ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA <i>IN VITRO</i> | |
| Resumen | 119 |
| Abstract..... | 120 |
| 4.1 Introducción | 121 |
| 4.2 Materiales y métodos..... | 123 |
| 4.3 Resultados y Discusión..... | 138 |
| 4.4 Conclusiones | 152 |
| 4.5 Literatura citada | 153 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 156 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 170 |
| 5.3 Literatura citada | 172 |
| ANEXOS..... | 176 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México la agricultura es un sector productivo importante, ya que prácticamente de ahí se origina toda la producción de alimentos, además es una actividad fundamental en el medio rural en el que habita alrededor del 37 % de la población nacional (CEDRSSA, 2014). Entre los cultivos que se siembran está el de haba. La producción de haba se realiza en 14 entidades: Puebla, México, Tlaxcala, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Oaxaca, Morelos, Guerrero, Durango, Sonora, Guanajuato, Ciudad de México y Baja California. Sin embargo, los Estados de Puebla, México y Veracruz son los de mayor producción a nivel nacional (sumando haba verde y haba en grano), donde Puebla también destaca por ser el principal productor de haba de grano con una producción de 15, 000 toneladas (SIAP, 2019).

En México a pesar de que se destinan 1.91 millones de hectáreas de siembra para las leguminosas, solo 1.72 % se asigna para la siembra de haba (SIAP, 2018). Esta leguminosa no representa un ingreso significativo del valor total de la producción nacional (\$ 348, 418, 619), ya que solo aporta el 0.25 % (\$ 879, 022, sumando haba en verde y en grano) (SIAP, 2018). Sin embargo el cultivo de haba es importante para las regiones productoras de Tlaxcala y Puebla, en donde se usa principalmente para la venta y como alimento en distintos platillos típicos (Jordán-Aguilar *et al.*, 2019; Fuentes-Herrera *et al.*, 2020).

El consumo per cápita de haba en México es bajo. En 1925 fue de 0.957 kg, mientras que en 1989 descendió 42 % (0.552 kg per cápita) (ASERCA, 2001), y posiblemente se ha mantenido con 0.522 kg per cápita (Orozco *et al.*, 2013), ya que en la actualidad no hay un referente del consumo per cápita de haba, pero se infiere que es sumamente bajo en comparación del frijol con un consumo de 10.1 kg per cápita (Gaucín, 2019).

El haba ha generado interés en la investigación por sus características nutricionales y/o funcionales. Debido a su contenido alto en proteínas (28 - 29 %) (Khazaei y Vandenberg, 2020), carbohidratos (60 %) (Cerning *et al.*, 1975) en el que se incluyen a la fibra dietética (20-26%) (Giczewska y Borowska, 2003) y por sus compuestos bioactivos (Multari *et al.*, 2015; Turco *et al.*, 2016). Estos se definen como fitoquímicos o metabolitos secundarios con efectos beneficiosos en la salud, que previenen o reducen enfermedades principalmente crónicas (Drago *et al.*, 2006). El haba podría ser considerada una excelente fuente para la extracción de fitoquímicos importantes como los compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes, lo que protege a las células del estrés

oxidativo (Thirumurugan *et al.*, 2018). La oxidación conlleva a la aparición de enfermedades principalmente cardiovasculares, pero también de cáncer y en enfermedades neurodegenerativas. Por tal motivo, se debe consumir alimentos no solo que contengan un alto valor nutrimental, sino también que sean una fuente rica de antioxidantes (Coronado *et al.*, 2015). En *Vicia faba* L. se pueden encontrar compuestos fenólicos entre estos los ácidos: cafeico, *p*-cumárico y ferúlico (Turco *et al.*, 2016). También L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (Apaydin *et al.*, 2000) que es un compuesto indispensable en el tratamiento del mal de Parkinson (Florán-Garduño y Rangel-Baraja, 2005). En la actualidad L-DOPA sigue siendo el principal compuesto en el tratamiento de Parkinson y *V. faba* es una fuente biológica para su producción (Patil *et al.*, 2013). La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neuronal degenerativa que es causada por un desequilibrio de dopamina y acetilcolina en el estriado del cerebro. Ese desequilibrio se origina por la degeneración de las células que producen dopamina, que provocan la alteración de neurotransmisores que controlan los movimientos, la memoria, la inteligencia, el ánimo (estado), el sueño, la digestión y el apetito (Randhir *et al.*, 2002). Así que, para reactivar el buen funcionamiento de los neurotransmisores es indispensable el suministro de L-DOPA para que la dopamina sea sintetizada. En México, la Secretaría de Salud (2019) indica que es el segundo padecimiento neurodegenerativo que prevalece en personas adultas mayores de 50 años. Aunque no se cuentan con cifras exactas, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía estima 50 casos nuevos, cada 100 mil habitantes al año, y en el mundo con la enfermedad prevalecen cinco millones de personas mayores de 50 años.

El efecto benéfico en la salud de los compuestos fenólicos también es generado por el grupo de los flavonoides ya que se ha documentado que además de tener actividad antioxidante, también tienen efecto protector como antiapoptótico, anticancerígeno, antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano (Magalingam *et al.*, 2015), antihipertensivo, quimiopreventivo y antidiabético (Turco *et al.*, 2016). Entre estos el haba puede proveer de isoflavonas como daidzeína que es un fitoestrógeno que previene el cáncer de próstata y de mama, además de que reduce los síntomas provocados en la etapa del climaterio de la mujer (Duncan *et al.*, 2003; Křížová *et al.* 2019).

El haba ya sea en verde o seco (grano) comúnmente es consumida como alimento, sin embargo, no solo el grano proporciona compuestos bioactivos. También en otros tejidos de la planta de haba se encuentran presentes y en cantidades superiores, como en las hojas (Neugart *et al.*, 2015), en el tallo (Kaufman *et al.*, 1997; Fuentes-Herrera, 2016), en las flores (Hu *et al.*, 2015) o en las plantas

(Randhir y Shetty, 2003; Kirakosyan *et al.*, 2004; Etemadi *et al.*, 2018), lo que posicionan a la especie como un cultivo valioso e interesante para su estudio.

Investigaciones demuestran que los contenidos de estos fitoquímicos dependen de la variedad, (Boudjou *et al.*, 2013) del genotipo (Kirakosyan *et al.*, 2014; John *et al.*, 2016; John *et al.*, 2017), de las condiciones de crecimiento (John *et al.*, 2016; John *et al.*, 2017; Etemadi *et al.*, 2018), de los métodos de procesamiento (Boukhanouf *et al.*, 2016; Etemadi *et al.*, 2018), de la etapa de desarrollo de la planta (Randhir y Shetty, 2003), de la estructura vegetal utilizadas (Kaufman *et al.*, 1997; Hu *et al.* 2015; Etemadi *et al.*, 2018), entre otros. Por tal motivo estos factores son importantes de estudiar para obtener resultados consistentes que puedan ser útiles para la producción de compuestos bioactivos a partir de *V. faba*.

En México el haba es destinada para consumo humano o animal, sin embargo, puede tener un aprovechamiento integral con los fitoquímicos encontrados en los tejidos de la planta, por lo que *V. faba* podría ser propuesta como una planta medicinal para la obtención de compuestos bioactivos. No obstante, para valorar su producción es necesario conocer la rentabilidad que esta nueva práctica les podría proporcionar a los productores de haba, así como se ha realizado en otros cultivos como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), maíz (*Zea mays*) y chile (*Capsicum annuum*). (Carrillo-Martínez *et al.*, 2019).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es segundo centro de diversidad genética de *Vicia faba* L. (FAO, 2006). Entre los Estados de mayor producción se encuentra Puebla, México, y Veracruz, además Puebla destaca por ser el principal productor de grano de haba (SIAP, 2019). Aunque el haba es cultivada en diferentes territorios de México cabe resaltar que, en comparación de otras leguminosas, la producción es baja y el consumo per cápita al transcurrir los años ha ido decreciendo considerablemente.

V. faba contiene compuestos bioactivos que podrían disminuir y/o prevenir síntomas y padecimientos crónicos. Por lo que es importante investigar el tipo y contenido de metabolitos que están presentes, para que esta especie no sólo sea aprovechada como alimento sino también como una planta medicinal.

En México se debería de considerar a esta especie como una prioridad de estudio por diversos aspectos, entre estos, por su contenido alto en fitoquímicos importantes para la salud, por ser una especie que a pesar de no ser nativa se ha adaptado en distintos territorios del país y porque con base en el último informe nacional sobre los recursos fitogenéticos en México, se menciona que el haba requiere mayor atención como recurso (FAO, 2006).

Hasta la fecha en México los estudios realizados en haba están enfocados en el área agronómica, principalmente, conocimiento del agricultor en la selección de variedades (Díaz-Bautista *et al.*, 2008), evaluación de poblaciones sobresaliente (Orozco *et al.*, 2013) o material genético sobresaliente (Pérez *et al.*, 2014) y acumulación de metales en el cultivo (Prieto *et al.*, 2017). Mientras que en otros países existen estudios relacionados con la cuantificación y detección de sus compuestos bioactivos como son en los compuestos fenólicos (Boukhanouf *et al.*, 2016), L-DOPA (Etemadi *et al.*, 2018), flavonoides y daidzeína (Kirakosyan *et al.*, 2004). Actualmente no se cuentan con investigaciones sobre la rentabilidad de la producción de haba y de la planta de haba, estudios que se han realizado en cultivos, como el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.) y chile (*Capsicum annum.*) que han contribuido a conocer su sistema de producción y valorar su cultivo (Carrillo-Martínez *et al.*, 2019).

Aunque en *V. faba* se han investigado los compuestos bioactivos, los estudios escasamente han sido realizados con variedades de haba mexicanas, además suelen ser estudios aislados, sobre cada tipo de metabolito y no de forma conjunta. Tampoco hay trabajos en donde se consideren diferentes condiciones de crecimiento de la planta como es a nivel de campo e invernadero. Al igual se desconoce el efecto que pueda tener el método de procesamiento en el contenido de compuestos bioactivos. Además, no se sabe sobre los contenidos y rendimientos que se puedan obtener de estos metabolitos en las distintas variedades de haba de diferente precocidad, por estructura vegetal y etapa de desarrollo evaluada. También se desconoce los costos de producción y rentabilidad que les podría proporcionar a los productores de haba esta innovación tecnológica.

La falta de información documentada sobre el tipo de fitoquímicos que pueden aprovecharse en la planta de haba de cultivares mexicanos, lleva al planteamiento de las preguntas de investigación: *¿pueden ser aprovechadas las variedades de habas mexicanas para obtener compuestos bioactivos?, ¿qué tipo de variedades (de floración tardía o temprana) tendrán las concentraciones más altas de compuestos bioactivos?, ¿en qué tejido de la planta se encuentran los contenidos más*

altos de estos compuestos bioactivos?, ¿bajo qué condiciones de crecimiento los tejidos de la planta de haba pueden proporcionar los contenidos más altos?, ¿qué variables agroambientales influyen en el contenido de los fitoquímicos?, ¿cuáles serán los rendimientos de los compuestos bioactivos obtenidos de la planta de haba?, ¿tendrán los compuestos bioactivos encontrados en los tejidos de la planta de haba alguna actividad biofuncional?, ¿cuáles son los costos de producción de haba verde y planta de haba?, ¿cuál será la rentabilidad de la producción de haba verde y de plantas de haba? y ¿será más rentable para los productores producir plantas de haba que haba verde?

El trabajo de investigación generará conocimiento científico más profundo respecto al contenido de compuestos bioactivos presentes en las variedades de haba mexicanas. Esto potenciaría el uso de *V. faba* para su futura aplicación en el sector agrícola y en la salud. Además, conociendo la situación actual del cultivo de haba, baja producción y consumo, su uso se podría impulsar con la obtención y/o extracción de compuestos bioactivos para la elaboración de un producto funcional y/o nutracéutico.

HIPÓTESIS

Hipótesis general

Los tejidos de la planta de haba de variedades mexicanas en estudio, bajo una condición de crecimiento y método de procesamiento, presentan concentraciones diferentes de compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados y utilizados por el ser humano como suplementos y/o productos funcionales. Además, con la producción de plántulas de haba los agricultores pueden tener una mayor rentabilidad que con la producción de haba verde.

Hipótesis particulares

1. La concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en plantas y flores de haba se ve influenciada por las condiciones de crecimiento en donde se desarrolló la planta y los métodos de procesamiento utilizados.

2. La estructura vegetal, la precocidad de la variedad y la condición de crecimiento, determinan el contenido y rendimiento de compuestos bioactivos presentes en las variedades de haba mexicanas estudiadas.
3. La producción de la planta de haba tanto en campo como en invernadero es menos costosa y más redituable económicamente que la producción de haba verde.
4. La cantidad de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos de la planta de haba, confirman que *V. faba* es un cultivo funcional que puede ser aprovechado por el ser humano como suplemento y/o producto funcional para mejorar la salud.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer, cuantificar y obtener los rendimientos de los compuestos bioactivos; compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e isoflavonas (daidzeína), encontrados en la planta de haba de variedades mexicanas, y evaluar la influencia que tienen algunos factores, como la condición de crecimiento y los métodos de procesamiento, en el contenido de estos fitoquímicos. Además de estimar la rentabilidad de una innovación tecnológica para el cultivo de haba que podría aportarles a los productores.

Objetivos específicos

1. Determinar en plantas de 10, 15 y 20 días después de la emergencia, botones florales y flores abiertas de haba, el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales bajo dos condiciones de crecimiento, y conocer el efecto que tienen dos métodos de procesamiento en el contenido de estos metabolitos.
2. Conocer el contenido, rendimiento y aprovechamiento de compuestos bioactivos; compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y daidzeína, en plantas y flores de cuatro variedades de haba mexicanas, en función de la estructura vegetal, la precocidad y la condición de crecimiento.

3. Evaluar económicamente la innovación tecnológica, producción de plantas de 20 días después de la emergencia, en campo y en invernadero, y realizar un análisis comparativo con la producción de haba verde, mediante la estimación de costos de producción y rentabilidad.
4. En las plantas de cuatro variedades de haba mexicanas, estimar el rendimiento de los compuestos bioactivos por planta, metro cuadrado y parcela. Así como también evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante y la actividad anti-inflamatoria que presenta el extracto del tejido de la planta de haba.

El trabajo de tesis, se integra en cuatro capítulos. En el Capítulo I, se da a conocer cómo la condición de crecimiento (campo abierto e invernadero) y el método de secado influyen en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales presentes en la plántula y flor de *V. faba*. En el Capítulo II, se evaluó la concentración y rendimiento de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, L-DOPA y daidzeína en plantas y flores de cuatro variedades de haba mexicanas bajo condiciones de crecimiento distintas; campo e invernadero, y también se trabajó con variables agroambientales para conocer cómo influyen en la síntesis de estos metabolitos. En el Capítulo III, se realizó una evaluación económica de una innovación tecnológica para el cultivo de haba por medio de un análisis de costos de producción y rentabilidad de haba verde y planta de haba. En el Capítulo IV se da a conocer los rendimientos de los compuestos bioactivos por planta, por kilogramo de materia seca y por metro cuadrado, además de que se evaluó la actividad antioxidante y la actividad anti-inflamatoria de los extractos de tejido de la planta de haba.

LITERATURA CITADA

Apaydin H., S. Ertan, S. Özekmekçi. 2000. Broad Bean (*Vicia Faba*)—A Natural Source of L-Dopa—Prolongs “On” Periods in Patients With Parkinson’s Disease Who Have “On–Off” Fluctuations. *Movement Disorder Society* 15: 163-179.

- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2001. Claridades Agropecuarias Órgano Desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2116-102. México D.F.
- Boudjou S., B. Dave O., F. Zaidi, F. Hosseinian. 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 138: 1543–1550.
- Boukhanouf S., H. Louaileche, D. Perrin (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.
- Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria (CEDRSSA). 2014. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014. INEGI – SAGARPA. Disponible en: <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/51> Consultada el 5 de abril de 2020.
- Cerning, J., Saposnik, A., Guilbot, A. 1975. Carbohydrate composition of horse beans (*Vicia faba*) of different origins. *Cereal Chemistry*. 52:125-138.
- Coronado H. M., S. Vega, L.R. Gutiérrez T., M. Vázquez F., C. Radilla V. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de nutrición*. 42: 2006-2012.
- Drago S. M. E., M. López L., T. R. Sainz, E. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37:58-68.
- Duncan A., M., W. Phipps R. and M. Kurzer S. 2003. Phyto-estrogenos. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 17:253–271.
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141.
- Florán-Garduño B., C. Rangel-Barajas. 2005. Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Revisión Biomedica*. 16:273-280.
- FAO. 2006. Informe Nacional Sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la alimentación, México. En *Food and Agriculture Organization*. Consultada el 20 de noviembre de 2014. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/mexico.pdf>

- Fuentes-Herrera P. B., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, J. I. Olvera-Hernández, Ma. L. Luna-Guevara. 2020. Percepción del consumo y uso de haba: aporte nutricional en Ciudad Serdán, Puebla, México. *Revista Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 17:1-16.
- Fuentes-Herrera P. B. 2016. Valor nutritivo y nutraceuticos en colectas de haba (*Vicia faba* L.) pertenecientes a los principales estados productores de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla (COLPOS), pp. 108-114.
- Gaucín D. 2019. “El mercado mundial y nacional del frijol”, *El Economista*, 28 de marzo Disponible en: <https://www.economista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-frijol-20190328-0088.html> (Consultada el 29 de marzo de 2020).
- Giczewska, A., Borowska, J. 2003. Nutritional value of broad bean seeds. Part 1: Starch and fiber. *Nahrung/Food* 47: 95-97.
- Gobierno de México. 2019. Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es> (Consultada el 6 de octubre de 2020).
- Díaz-Bautista M., B. E. Herrera-Cabrera, J. Ramírez-Juárez, M. Aliphath-Fernández, A. Delgado-Alvarado. 2008. Conocimiento campesino en la selección de variedades de haba (*Vicia faba* L.) en la sierra norte de Puebla México. *INTERCIENCIA*. 3:610-615.
- Hu J., S. J. Kwon, J. J. Park, E. Landry, D. S. Mattinson, D. R. Gang. 2015. LC-MS determination of L-DOPA concentration in the leaf and flower tissues of six faba bean (*Vicia faba* L.) lines with common and rare flower colors. *Functional Foods in Health and Disease*. 5(7):243-250.
- John M. K. M., F. Khan, D. L. Luthria, B. Matthews, W. M. Garrett, S. Natarajan. 2017. Proteomic and metabolomic analysis of minimax and Williams 82 soybeans grown under two different conditions. *Journal of Food Biochemistry* 41:1-8.
- John M. K. M., S. Natarajan, D. L. Luthria. 2016. Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. *Food Chemistry* 211: 347–355.
- Jordán-Aguilar B., R. Díaz-Ruíz, I. Ocampo-Fletes, C. Jacinto-Hernández, J. A. S. Escalante-Estrada, E. Pérez-Ramírez. 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*. 29: 2-23.

Kaufman P. B., A. Duke J., H. Brielmann, J. Boik, J.E. Hoyt.1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *The journal of alternative and complementary medicine* 3:7-12.

Kirakosyan A., P. B. Kaufman, J. A. Duke, S. Warber, S. Bolling. 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). *Evidence-Based Integrative Medicine* 1:131-135.

Khazaei H., A. Vandenberg. 2020. Seed Mineral Composition and Protein Content of Faba Beans (*Vicia faba* L.) with Contrasting Tannin Contents. *Agronomy*. 10: 511.

Křížová L., K. Dadáková, J. Kašparovská and T. Kašparovský. 2019. Isoflavones. *Molecules* 24: 1-28.

Magalingam K. B., A. K. Radhakrishnan, N. Haleagrahara. 2015. Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 314560: 1-14.

Multari S., D. Stewart, W. R. Russell. 2015. Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 511 -522.

Neugart, S., S. Rohnb, M. Schreiner. 2015. Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in *Vicia faba* and *Pisum sativum* leaves by HPLC-DAD-ESI-MSn and the genotypic effect on their flavonoid profile. *Food Research International* 76:114-121.

Orozco C. N., D. de J. Pérez L., A. González H., O. Franco M., F. Gutiérrez R., M. Rubí A., Á. Castañeda V., A. Balbuena M. 2013. Identificación de poblaciones sobresalientes de haba colectadas en el Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:921-932.

Patil S. A., O. A. Apine, S. N. Surwase, J. P. Jadhav. 2013. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. *Advances in Parkinson Diseases*. 2: 81-87.

Pérez L. D. J., A. González H., O. Franco M., M. Rubí A., J. F. Ramírez D., A. Castañeda V., J. G. Aquino M. 2014. Aplicación de métodos multivariados para identificar cultivares

sobresalientes de haba para el Estado de México, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5; 265-278.

Prieto G. F., J. Callejas H., A. D. Román G., J. Prieto M., A. J. Gordillo M., M. A. Méndez M. 2007. Acumulación de arsénico en el cultivo de habas (*Vicia faba*). *Agronomía Costarricense*. 31: 101-109.

Randhir R., P. Shetty, K. Shetty. 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*. 37:1247–1256.

Randhir R., K. Shetty. 2003. Light-mediated fava bean (*Vicia faba*) response to phytochemical and protein elicitors and consequences on nutraceutical enhancement and seed vigour. *Process Biochemistry* 38: 945-952.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/ (Consultado el 26 de marzo de 2020).

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado el 8 de noviembre de 2020).

Thirumurugan D., A. Cholarajan, S.S.S. Raja, R. Vijayakumar. 2018. Introductory Chapter: Secondary Metabolites. Chapter 1. En R. Vijayakumar and S.S.S. Raja. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. IntechOpen. 3-21 pp.

Turco I., G. Ferretti, T. Baccetti. 2016. Review of the health benefits of Fava bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *Journal of Food and Nutrition Research* 55:283-293.

CAPÍTULO I: ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS Y FLORES DE HABA (*Vicia faba* L.) BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MÉTODOS DE PROCESAMIENTO

Resumen

Vicia faba L. contiene compuestos bioactivos como compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT), siendo estos, fitoquímicos con propiedades farmacológicas. Además del grano, también se encuentran y en mayor cantidad en los tejidos de la planta. Sin embargo, existen factores que interfieren en sus contenidos como la condición en donde se desarrolla la planta y el método de secado utilizado en el tejido. El objetivo fue cuantificar los CFT y FT en plantas de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE), en botones florales (BF) y en flores abiertas (FA) crecidas en condiciones de campo e invernadero, así como conocer el efecto del secado en estufa y en liofilización. El cultivar Calvario fue sembrado en campo, y en invernadero con sustrato en suelo y en tezontle. Se cosecharon las plantas, BF y FA, y se procesó la mitad del material vegetal con liofilización y la otra con estufa. Posteriormente con el material vegetal se realizaron análisis de CFT y FT con espectrofotometría UV-visible en microplaca. Los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en las condiciones de crecimiento y en los métodos de procesamiento. En campo se presentaron los valores más altos de CFT y FT tanto en las plantas (109.63 mg EAG g⁻¹ y 110.07 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) como en las flores (157.84 mg EAG g⁻¹ y 157.16 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) en comparación con los de invernadero. Dentro de invernadero, invernadero-tezontle tuvo los contenidos más altos de CFT y FT en las plantas (81.88 mg EAG g⁻¹ MS y 83.32 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) y en las flores (155.09 mg EAG g⁻¹ y 118.00 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) en comparación con invernadero-suelo. Respecto al método de secado, los CFT y FT de las plantas en condición de campo se conservaron mejor por estufa que liofilizado. Mientras que en invernadero-suelo e invernadero-tezontle se conservaron mayormente con liofilizado. Las plantas mostraron una tendencia de contenido decreciente de ambos compuestos de las plantas más jóvenes (10 DDE) a las más adultas (20 DDE). Los contenidos de CFT y FT en las plantas fueron menores a los obtenidos en BF y FA. Los resultados evidenciaron que la condición de crecimiento y el método de secado, influyen en el contenido de estos compuestos bioactivos.

Palabras claves: campo, compuestos bioactivos, flavonoides totales, invernadero, liofilización, secado.

Abstract

Vicia faba L. contains bioactive compounds such as total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TF), these being phytochemicals with pharmacological properties. In addition to the grain, they are also found and in greater quantity in the plant's tissues. However, there are factors that interfere with its contents, such as the condition in which the plant develops and the drying method used on the tissue. The aim was to determine the content of TPC and TF in plants 10, 15 and 20 days after emergence (DAE), in flower buds (FB) and in open flowers (OF) grown in field and greenhouse conditions, as well as know the effect of oven-drying and freeze-drying. The Calvario cultivar was sown in field and in a greenhouse, in a greenhouse with soil and tezontle substrate. The plants, FB and OF were harvested, and half of the material was processed with freeze-drying and the other with an oven-drying. Subsequently, the material was analyzed for TPC and TF with UV-visible spectrophotometry on a microplate. The results showed significant differences ($p \leq 0.01$) in the growth conditions and in the processing methods. In the field, the highest contents of TPC and TF were presented both in plants (109.63 mg GAE g⁻¹ and 110.07 mg QE g⁻¹ DW, respectively) and in flowers (157.84 mg GAE g⁻¹ and 157.16 mg QE g⁻¹ DW, respectively) compared to those in the greenhouse. Inside the greenhouse, greenhouse-tezontle presented the highest contents of TPC and TF in plants (81.88 mg GAE g⁻¹ DW and 83.32 mg QE g⁻¹ DW, respectively) and in flowers (155.09 mg GAE g⁻¹ and 118.00 mg QE g⁻¹ DW, respectively) compared to greenhouse-soil. Regarding the drying method, the TPC and TF of the plants in field condition were better preserved by oven-drying than freeze-drying. While in greenhouse-soil and greenhouse-tezontle they were preserved mostly with freeze-drying. The plants show a trend of decreasing content of both compounds from the youngest plants (10 DAE) to the most adult (20 DAE). The TPC and TF contents in the plants were lower than those obtained in FB and OF. The results showed that the growth condition and the drying method influence the content of these bioactive compounds.

Keywords: bioactive compounds, field, freeze-drying, greenhouse, total flavonoids, oven-drying.

1.1 Introducción

El haba (*Vicia faba* L.) es una planta leguminosa que se ha propuesto como un cultivo estratégico para alimentar a la creciente población mundial, debido a su alto contenido de proteínas, fibra y compuestos bioactivos que pueden ayudar a mejorar la salud humana. Además, por ser un cultivo con características agronómicas favorables, para abordar los futuros desafíos agrícolas (Multari *et al.*, 2015).

Entre las bondades que proporciona el haba se encuentran a los compuestos bioactivos, los cuales, son fitoquímicos con propiedades farmacológicas (Drago *et al.*, 2006). Entre estos, se tienen a los compuestos fenólicos (CF) que se caracterizan por ser antioxidantes; capturan a los radicales libres y son quelantes de metales, confiriendo para quienes los consuma un beneficio en la salud (Gimeno, 2004). Turco *et al.* (2016) revisó ampliamente los tipos de CF que contiene el haba así como el efecto protector que podrían tener contra el desarrollo de enfermedades (protección contra el estrés oxidativo, antihipertensivo, quimiopreventivo, antidiabético).

Generalmente se ha reportado CF en el haba, inmadura (Baginsky *et al.*, 2013), madura, haba completa (testa + cotiledón) o fraccionada (vaina, testa, cotiledón) (Chaieb *et al.*, 2011; Boukhanouf *et al.*, 2016). Sin embargo, no solo en el grano se encuentran estos compuestos bioactivos, también se localizan en los tejidos de la planta. La planta de esta leguminosa contiene levo-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), aminoácido no-proteico con estructura de un ácido fenólico (Siqueira-Soares *et al.*, 2013), y es el principal precursor del neurotransmisor dopamina. L-DOPA es recomendada para disminuir los espasmos severos y la distonía ocasionados por la enfermedad de Parkinson (Ehringer y Hornykiewicz, 1998; Miranda *et al.*, 2000). Además, contienen cantidades altas de flavonoides, que brindan al organismo un efecto antioxidante y antiinflamatorio (Turco *et al.*, 2016). Entre los flavonoides que han sido investigados en la especie se tiene que, en las hojas de las plantas de haba de ocho semanas de edad, el principal flavonoide es el flavonol kaempferol, incluso contiene glucósidos de quercetina (Neugart *et al.*, 2015). Al igual se demostró que en tallos (Kaufman *et al.*, 1997; Fuentes-Herrera *et al.*, 2020) o en plantas (Kirakosyan *et al.*, 2004) se pueden encontrar isoflavonas como daidzeína y genisteína, las cuales tienen una función como fitoestrógenos en el organismo.

Así que para la obtención de CF no es necesario que la planta llegue hasta el desarrollo del grano, dado que estos fitoquímicos se encuentran en tejidos o en plantas de haba, lo que reduce

considerablemente el tiempo del estado fenológico para la obtención de estos metabolitos; del estadio principal 7 (formación del fruto) al 1 (desarrollo de las hojas en el tallo) (BBCH, 2018).

La industria farmacéutica constantemente busca y caracteriza componentes bioactivos encontrados en las plantas y en los alimentos, para la elaboración de nuevos fármacos para tratar y/o prevenir enfermedades (Drago *et al.*, 2006). Por lo que *V. faba* podría ser aprovechada para la obtención de compuestos bioactivos como los CF. Sin embargo, algo importante de considerar es que los contenidos de CF en los tejidos de la planta no permanecen constantes, ya que hay factores que lo determinan. Al respecto, Etemadi *et al.* (2018) muestran en la planta del haba que la biosíntesis y acumulación del compuesto fenólico L-DOPA, varía con relación a algún tipo de estrés o manejo del cultivo (por sequía o por aplicación de nitrógeno) y por el método de procesamiento usado en el tejido; congelado, secado en estufa, secado al aire, entre otros. Al igual, en haba los métodos de cocción (hervido y vapor), tienen un efecto en el contenido de fitoquímicos y su capacidad antioxidante (Boukhanouf *et al.*, 2016). También estudios recientes en otra leguminosa como la soya (*Glycine max*), demuestran que tanto las condiciones de crecimiento (campo e invernadero) y la variación genética, tuvieron una influencia significativa en la composición del contenido de metabolitos (Maia *et al.*, 2016; John *et al.*, 2017). Sin embargo, en *V. faba* no se ha documentado la acumulación de metabolitos secundarios con relación a las condiciones de crecimiento.

Dado que *V. faba* contiene CF en la planta o en tejidos de la planta con propiedades farmacológicas, pero existen factores que determinan sus contenidos como son la condición en donde se desarrolla la planta y el método de secado utilizado. El estudio tuvo como objetivo determinar en plantas de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE), en botones florales (BF) y en las flores abiertas (FA) de *V. faba*, el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) bajo dos condiciones distintas de crecimiento, campo e invernadero (sustratos: suelo y tezontle). Además de conocer el efecto que tiene el secado (estufa o liofilización) en la concentración de los CF y FT.

1.2 Materiales y métodos

Material vegetal

El cultivar de haba C-Calvario, fue obtenido del agricultor, Sr. Daniel Mani de la comunidad de San Agustín Calvario de San Pedro Cholula, Puebla. Las características morfológicas de la semilla del haba son: color de testa entre café y verde, y de cotiledón amarillo, 2 cm de largo y 1.5 cm de ancho aproximadamente, por su tamaño es considerada como cultivar tipo Cochinera (Figura 1.1).

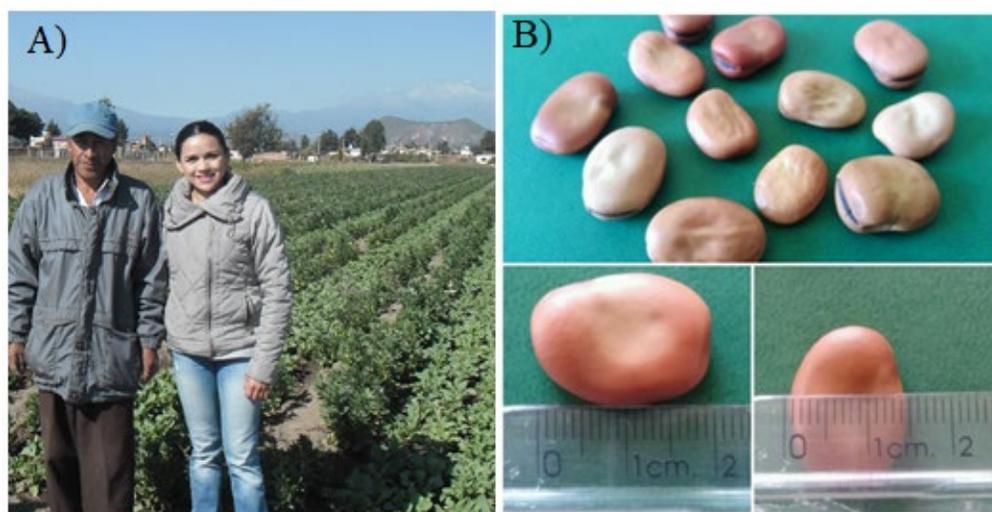


Figura 1.1 A) Productor de haba de la comunidad de San Agustín Calvario municipio de San Pedro Cholula, Puebla, y B) características morfológicas del cultivar C-Calvario.

Siembra del material vegetal bajo condiciones distintas de crecimiento

El cultivar de haba C-Calvario se sembró bajo condiciones distintas de crecimiento (CONC) campo e invernadero. La siembra en campo se realizó de acuerdo con las labores tradicionales del agricultor a mediados del mes de septiembre del 2017, en San Agustín Calvario (19° 03' 03'' latitud norte, 98° 20' 37'' longitud oeste).

La siembra en invernadero se realizó en un sistema de producción de baja tecnología, con una cubierta de plástico de 20 % de sombreado (720 galgas, 180 micras de espesor). Ahí se sembró el cultivar C-Calvario establecida en suelo y en arena de tezontle rojo a principios del mes de octubre

del 2017 en la comunidad de San Agustín Calvario, cerca de donde se realizó la siembra en campo, localizado en las coordenadas 19° 03' 00'' latitud norte y 98° 20' 04'' longitud oeste.

Invernadero-suelo. Las semillas fueron sembradas en bolsas de plástico de 35 x 35 cm con 7 kg de una mezcla de suelo [50 % composta (estiércol de vacuno) y 50 % suelo de cultivo], se depositaron cinco semillas en cada bolsa de plástico a una profundidad de 2 cm. Un día antes de la siembra se humedeció el suelo con agua de pozo. Cuando las semillas comenzaron a emerger (aproximadamente 7 días después de la siembra), el suelo se mantuvo húmedo con riego (sin exceso para evitar enfermedades), durante el desarrollo de las plantas. Las prácticas de manejo del cultivo fueron a) aclareo: dejar 2 plantas por maceta después de los 20 días después de la emergencia (DDE), b) deshierbe; cuando era necesario, y c) tutoreo de los hijuelos; cuando las plantas tuvieron una altura de aproximadamente 40 cm.

Invernadero-tezontle. La siembra y el cultivo de las semillas se realizó de la misma manera que en la de suelo, pero se utilizó como sustrato arena de tezontle rojo y como riego solución nutritiva. La solución nutritiva utilizada fue la solución universal de Steiner al 100% (Steiner, 1984). Un día antes de la siembra el tezontle se humedeció con agua potable, a partir de la siembra y durante la emergencia de las semillas (aproximadamente 12 días después de la siembra), el riego se hizo con agua de pozo y después cuando la planta tuvo 5 DDE se comenzó a regar con solución nutritiva 1:3 (solución nutritiva:agua), a los 7 DDE a una proporción 1:1 y a los 10 DDE y durante todo el desarrollo de la planta cuando se observaba que el sustrato se encontraba seco se regó con solución nutritiva 100 %.

Identificación, recolección y procesamiento del material vegetal

Al campo y al invernadero experimental se fue cada tercer día entre las 8:00 y 9:00 am. Cuando las plantas comenzaron a emerger, epicótilo (tallo) expuesto sobre el nivel del suelo, cada planta se identificó con estambre de distinto color, para monitorear la edad de las plantas. De esta manera se estableció y monitoreo el día de emergencia de las plantas, las cuales se cortaron a los 10, 15 y 20 DDE (± 1 día). Además, en la etapa de floración, se recolectaron los brotes florales (aproximadamente 60 DDE) y las flores abiertas (aproximadamente 70 DDE) (Figura 1.2).

Una parte de las plantas, de los brotes florales y de las flores abiertas se deshidrataron en estufa de convección forzada (SHEL LAB, 1370FX, E.U.A.), a 38 °C durante aproximadamente 24 h hasta que el porcentaje de humedad (% H) del material vegetal, determinado en termobalanza (OHAUS,

MB 45) estuviera entre 7-10 %. La otra parte del material vegetal fue cortado en pedazos pequeños (0.5 cm² aproximadamente) e introducido en bolsas pequeñas de tela pellón para después congelarlas a -20 °C. El material vegetal previamente congelado por 48 h se introdujo a una liofilizadora con sistema de liofilización FreeZone® Triad (Labconco, catálogo 7400040, E.U.A.). La temperatura del colector fue de -80 °C, la presión de vacío se mantuvo en 0.220 mbar, el procesamiento fue con dos ciclos cada uno con una duración de aproximada 4 h hasta tener una humedad entre 7-10 %. Posteriormente las muestras fueron trituradas en un triturador de granos de café (KRUPS, GX4100, E.U.A.), y se tamizó a 420 µm. El polvo se almaceno en frascos a 22 ± 2 °C, temperatura ambiente.



Figura 1.2 Plantas de *Vicia faba* L. desarrollado bajo distintas condiciones de crecimiento. **PC**; Planta en campo, **PIS**; Planta invernadero suelo, **PITZ**; Planta invernadero tezontle, **BF**; Brotes florales y **FA**; Flores abiertas.

Selección de longitud de onda para medición espectrofotométrica de CFT y FT

En la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT), diferentes estudios utilizan distintas longitudes de onda (Cuadro 1.1). Para saber la longitud de onda óptima para analizar las muestras de haba, se realizó un barrido espectral tanto para CFT como para FT (Fernandes *et al.*, 2012; Pekal y Pyrsynska, 2014). Los estándares y el extracto de metanol al 100 % fueron sometidos al procedimiento general de CFT y FT (que se describe en los siguientes apartados), las lecturas para el espectro de absorción UV-Visible fueron determinados de 600 – 765 nm para CFT y de 300 – 600 nm para FT.

Selección del solvente de extracción de CFT y FT

Existen diversas metodologías y solventes para la extracción de CF (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Cada muestra posee diferentes CF y contenidos (Pekal y Pyrsynska, 2014), por lo que es importante evaluar el solvente que se utiliza en la extracción. Por tal motivo se decidió realizar pruebas para la extracción de estos compuestos con dos solventes etanol al 100 % (J.T. Baker, 9000-03) y metanol (J.T. Baker, 9070-03) al 100 % y 70 %. Para la realización de este análisis solo se utilizó la muestra de planta de 10 DDE sembrada en campo.

Para la extracción se pesaron 10 mg de polvo de planta de haba y se diluyeron con 10 mL del respectivo solvente. La mezcla se homogenizó y se mantuvo por 30 min en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, AS5150B, China). Después se centrifugó a 4, 600 *g* a 4 °C (2 min) (HERMLE Labortechnik, Z 326 K), se extrajo el sobrenadante y el extracto se depositó en eppendorf para almacenarlos a -20 °C previo a su análisis.

Cuadro 1.1 Estándares y longitud de onda utilizados para cuantificar Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y Flavonoides Totales (FT) por espectrofotometría UV - Visible.

| Determinación | Estándar | Longitud de onda (nm) | Referencia |
|---------------|------------|-----------------------|------------------------------------|
| CFT | Ác. gálico | 750 | Bobo-García <i>et al.</i> (2015) |
| CFT | Ác. gálico | 720 | Uriarte y Isabel (2009) |
| CFT | Ác. gálico | 765 | Silva-Beltran <i>et al.</i> 2015 |
| FT | Catequina | 510 | Herald <i>et al.</i> (2012) |
| FT | Catequina | 510 | Magalhães <i>et al.</i> (2012) |
| FT | Rutina | 510 | Chaieb <i>et al.</i> (2011) |
| FT | Quercetina | 496 | Silva-Beltrán <i>et al.</i> (2015) |
| FT | Rutina | 415 | Farasat <i>et al.</i> (2014) |
| FT | Rutina | 410 | Fernández <i>et al.</i> (2012) |
| FT | Rutina | 408 | Matyushcheko y Stepanova (2003) |

Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

La metodología empleada fue en la que se basó Herald *et al.* (2012) con modificaciones. Para el análisis se ocupó el equipo lector multimodo espectral de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan flash, Reino Unido) y una microplaca (Costar de 96 pozos de fondo plano de polipropileno). Se utilizaron 25 μL de muestra o estándar, se agregaron 75 μL de agua desionizada y 25 μL de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 con agua desionizada), la solución se mezcló y reposó 6 min en oscuridad a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 100 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5 % disuelto en agua y nuevamente se mezcló la solución. Posteriormente se dejó en reposo 60 min en oscuridad a TA y se leyó a una longitud de onda de 725 nm. Para el blanco se utilizó una mezcla de los reactivos y disolventes usados en el análisis, pero sin el analito, en lugar de este se utilizó agua (25 μL). Para la curva se utilizó el estándar ácido gálico (Sigma, G7384) diluido en agua. La concentración de la curva de calibración fue de 0 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores que generaron la siguiente ecuación de la recta $y = 0.0065x + 0.1026$ ($R^2 = 0.9969$) (Figura 1.1A, Anexo). El estándar fue analizado por triplicado y la muestra por octuplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalente de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG g^{-1} MS). En la Figura 1.3 se aprecia un diagrama resumido.

Determinación de Flavonoides Totales

El contenido de FT fue determinado de acuerdo a Herald *et al.* (2012) con pequeñas modificaciones. Para ello se usó el lector multimodo espectral de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan flash) y una microplaca (Costar de 96 pozos de fondo plano de polipropileno). A 25 μL de muestra o estándar, se le agregaron 100 μL de agua desionizada y 10 μL de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5 %, se mezcló la solución y se dejó reposar por 5 min a TA. Después se añadieron 15 μL de cloruro de aluminio al 10 % (AlCl_3 , disuelto en metanol), se mezcló la solución y se dejó reposar por 6 min a TA. Pasado el tiempo se le adicionaron 50 μL de hidróxido de sodio a 1 M (NaOH) y 50 μL de agua desionizada, se mezcla la solución y se deja reposar 30 min en oscuridad a TA. Nuevamente la solución se mezcló y leyó a 400 nm. Todas las muestras y el estándar fueron medidos contra el blanco (mezcla de los reactivos y disolventes usados en el análisis, pero sin el analito, en lugar de este se utilizó agua). La quercetina (Sigma, Q4951) diluida en etanol absoluto (J.T. Baker, 9000-03) fue usado como estándar a diferentes concentraciones de 0 – 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtener la ecuación de la recta $y = 0.0017x + 0.1$ ($R^2 = 0.9986$) (Figura 1.2 A, Anexo). El

estándar fue analizado por triplicado y las muestras por octuplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalente de quercetina por gramo de materia seca (mg EQ g⁻¹ MS). La Figura 1.3 muestra un diagrama resumido del proceso.

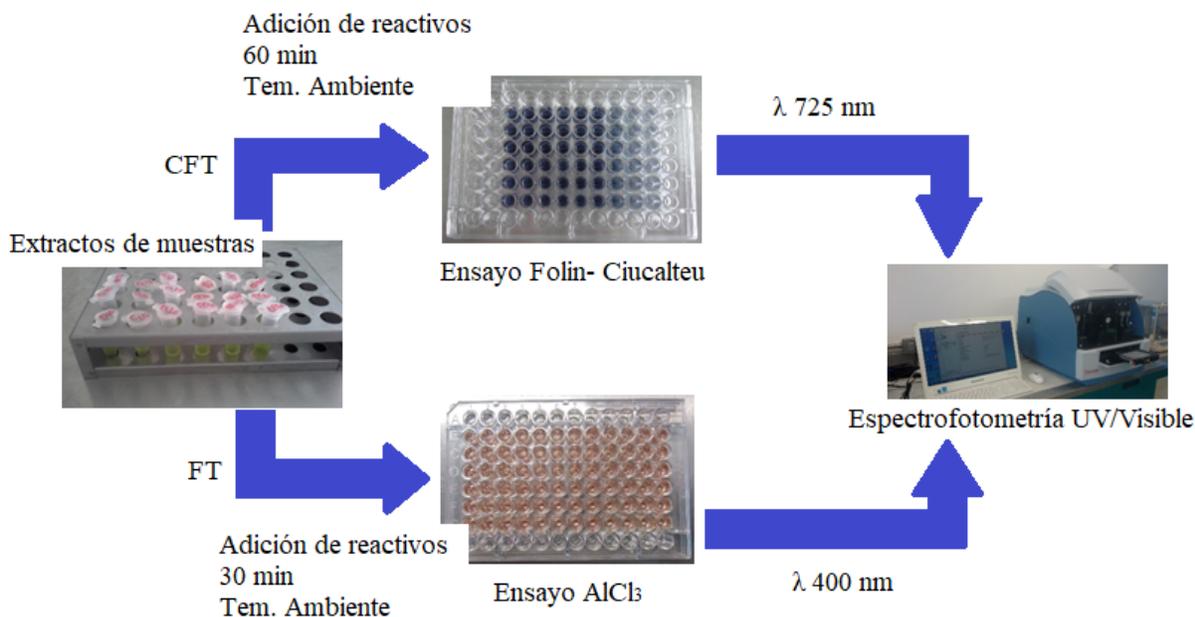


Figura 1.3 Diagrama del proceso para cuantificar Compuestos fenólicos totales (CFT) y Flavonoides totales (FT).

Análisis estadísticos

Con los resultados de CFT y FT en plantas y flores de *V. faba* bajo un diseño completamente al azar se realizaron los análisis estadísticos análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$, con el paquete estadístico SAS versión 9 (SAS, 2002).

1.3 Resultados y discusión

Selección de longitud de onda para medición espectrofotométrica de CFT y FT

Para determinar la longitud de onda en la determinación por espectrofotometría UV/Visible de CFT y FT en este estudio, se realizó un espectro de absorción a los estándares y a la muestra, como lo proponen algunos autores (Matyushcheko y Stepanova, 2003; Pekal y Pyrzinska, 2014). Los

resultados mostraron que los espectros de absorción del estándar ácido gálico (estándar utilizado para evaluar a los CFT) y el de la muestra, presentaron su máximo pico de absorbancia en el rango de 720 – 730 nm (Figura 1.4 a). Por lo que con base en estos resultados se consideró trabajar a 725 nm. En el caso del espectro del estándar de quercetina obtenido para la evaluación de FT fue similar al del trabajo de Pekal y Pyrzinska (2014), obteniendo su máximo pico de absorción en el rango de 300 - 320 nm (Figura 1.4 b). Mientras que el espectro de la muestra presento dos picos de absorción (uno a los 400 nm y el otro a los 500 nm); sin embargo, alrededor del rango de 390 - 415 nm muestra la mayor absorción. Así que de acuerdo a la mayor absorbancia encontrada tanto del estándar como de la muestra se eligió trabajar a 400 nm.

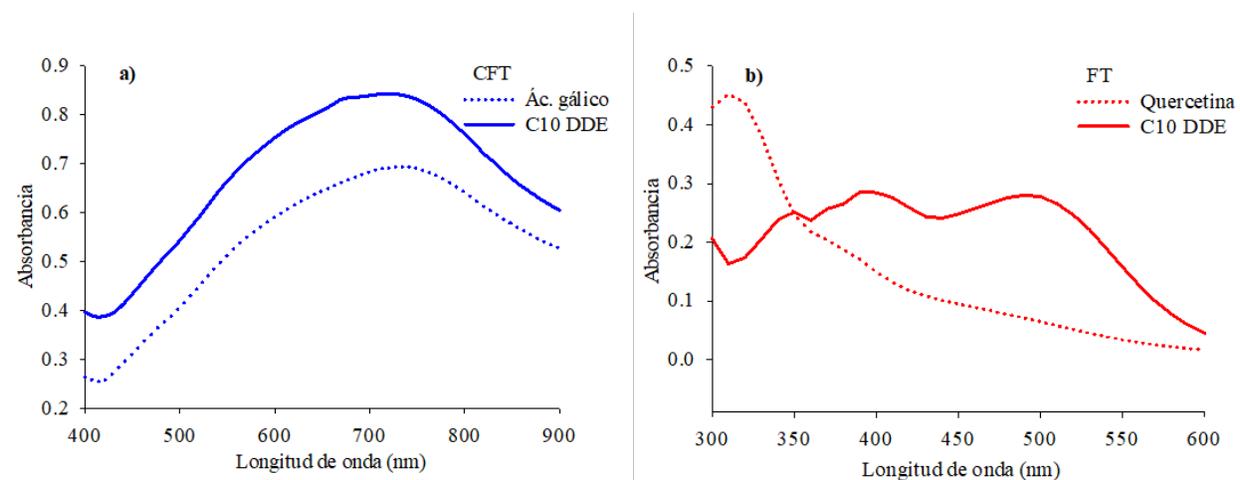


Figura 1.4 Espectros de absorción de los estándares (···) y muestra (—) de planta de 10 días después de emergencia sembrada en campo (C 10 DDE), después de los ensayos de: a) compuestos fenólicos totales (CFT) y b) flavonoides totales (FT).

Selección del disolvente de extracción de CFT y FT

Los resultados de la selección del disolvente para la extracción de los compuestos fenólicos mostraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) para CFT y FT con una media de 92.20 mg EAG g^{-1} MS y 92.75 mg EQ g^{-1} MS, respectivamente (Cuadro 1.1A, Anexo).

El análisis estadístico de comparación de medias comprueba que la extracción con metanol al 100 % tuvo los valores más altos de CFT (134.78 mg EAG g^{-1} MS) y FT (131.34 mg EQ g^{-1} MS), y fue estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) a los resultados con metanol al 70 % y etanol al 100 % en CFT, y solo con etanol al 100 % en FT (Cuadro 1.2). Con base en los resultados obtenidos se

decidió realizar las extracciones de todas las muestras con metanol al 100 %, por ser el disolvente que mejor extrajo los metabolitos en ambas determinaciones.

Es importante conocer el disolvente de extracción para los CF encontrados en el material vegetal de estudio, ya que por la polaridad que presentan estos compuestos, los contenidos varían dependiendo del disolvente utilizado. En *Salvia hispánica* se evaluaron los disolventes de extracción como metanol y *n*-hexano, siendo el metanol el disolvente que mejor extrajo los contenidos de CF con dos métodos de extracción: convencional y ultrasonido de alta intensidad (Corona-Jiménez *et al.*, 2016). También en semilla de haba completa o fraccionada (testa, cotiledón) para la obtención de CF se comparó como disolventes de extracción la acetona al 70 % y etanol al 80 %, y concluyeron que etanol acuoso se recomienda para extraer compuestos fenólicos (Boudjou *et al.*, 2013).

Cuadro 1.2 Comparación de medias de Tukey de los solventes de extracción de compuestos fenólicos.

| Variable | Solvente | Media |
|---|---------------|---------------------|
| CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | Metanol 100 % | 134.78 ^a |
| | Metanol 70 % | 131.48 ^a |
| | Etanol 100 % | 24.26 ^b |
| DMS | | 9.94 |
| FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | Metanol 100 % | 131.34 ^a |
| | Metanol 70 % | 113.61 ^b |
| | Etanol 100 % | 47.29 ^c |
| DMS | | 15.28 |

CFT: Compuestos fenólicos totales, FT: Flavonoides totales, DMS: Diferencia mínima significativa.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en plantas y flores de *Vicia faba* L.

En las plantas de *V. faba* el análisis de varianza de los resultados de CFT y FT mostraron que campo e invernadero presenta diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) con una media de 94.06 mg EAG g⁻¹ MS y 83.68 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) en ambos metabolitos fueron menores a 16 %. En la variable CFT las fuentes de variación CONC y DDE y la interacción MTDP*CONC, mostraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$), mientras que en la variable FT todas las fuentes de variación (CONC, MTDP y DDE) y la

interacción MTDP*CONC tuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) (Cuadro 1.3). En la condición de crecimiento invernadero-suelo contra invernadero-tezontle los resultados de CFT y FT presentan diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) con una media de 80.19 mg EAG g⁻¹ MS y 70.30 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. Los CV de las variables CFT y FT fueron menores a 20 %. Las fuentes de variación MTDP y DDE y la interacción MTDP*CONC en CFT tuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) y en FT todas las fuentes de variación (CONC, MTDP y DDE) y la interacción MTDP*CONC también mostraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Análisis de varianza de compuestos bioactivos en plantas de *Vicia faba* L. sembradas en condiciones de campo e invernadero.

| Variable | Media | CV (%) | Cuadrado medio | | | | |
|--|---------|--------|----------------------|----------------------|------------|-----------|--------|
| | | | CONC | MTDP | DDE | MTDP*CONC | ERROR |
| Campo e Invernadero | | | | | | | |
| CFT | 94.06** | 13.76 | 23276.12** | 150.94 _{NS} | 11783.86** | 2566.72** | 167.62 |
| FT | 83.68** | 15.35 | 66851.25** | 6480.22** | 7336.86** | 6629.21** | 165.07 |
| Invernadero suelo e Invernadero Tezontle | | | | | | | |
| CFT | 80.19** | 12.86 | 276.29 _{NS} | 18443.39** | 21951.17** | 5308.23** | 106.48 |
| FT | 70.30** | 19.39 | 16249.15** | 7422.78** | 15586.73** | 7265.07** | 185.89 |

CFT; Compuestos fenólicos totales (mg EAG g⁻¹ MS), FT; Flavonoides totales (mg EQ g⁻¹ MS), CV; Coeficiente de variación, MTDP; Método de procesamiento, CONC; Condición de crecimiento, DDE; Día después de la emergencia, NS; No significancia, ** $p \leq 0.01$; Diferencias altamente significativas.

En las flores de *Vicia faba* L. (BF + FA), los resultados del análisis de varianza de CFT y FT, muestran que en la condición de crecimiento campo e invernadero presenta efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) con una media de 155.37 mg EAG g⁻¹ MS y 130.19 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) de ambos metabolitos fueron menores a 15 %. En la variable CFT las fuentes de variación CONC y MTDP y la interacción CONC*MTDP mostraron efecto significativo, mientras que en la variable FT todas las fuentes de variación (CONC MTDP y estado de desarrollo de la flor (EDF) MTDP*CONC tuvieron efecto altamente

significativo ($p \leq 0.01$) excepto la interacción (Cuadro 1.4). Para la condición de crecimiento invernadero-suelo e invernadero-tezontle los resultados de CFT y FT muestran también tener diferencias efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) con una media de 154 mg EAG g⁻¹ MS y 110.61 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. Los CV de las variables fueron menores a 11 %. Todas las fuentes de variación (CONC, MTDP y EDF) y la interacción (MTDP*CONC) de ambas variables mostraron tener diferencias efecto significativo (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Análisis de varianza de compuestos bioactivos en las flores de *Vicia faba* L. sembradas en condiciones de crecimiento diferentes.

| Variable | Media | CV (%) | CUADRADO MEDIO | | | | |
|--|----------|--------|----------------|-----------|--------------------|----------------------|---------|
| | | | CONC | MTDP | EDF | MTDP*CONC | ERROR |
| Campo e Invernadero | | | | | | | |
| CFT | 155.37** | 1.89 | 390.03** | 43.02* | 1.77 ^{NS} | 146.10** | 10.95 |
| FT | 130.19** | 14.55 | 46529.29** | 3867.40** | 18147.86** | 282.55 ^{NS} | 359.260 |
| Invernadero-suelo e Invernadero-tezontle | | | | | | | |
| CFT | 154.00** | 1.36 | 76.95** | 100.00** | 123.43** | 19.95* | 4.40 |
| FT | 110.61** | 10.1 | 3488.82** | 2483.15** | 15256.88** | 850.67* | 124.91 |

CFT; Compuestos fenólicos totales (mg EAG g⁻¹ MS), FT; Flavonoides totales (mg EQ g⁻¹ MS), CV; Coeficiente de variación, MTDP; Método de procesamiento, CONC; Condición de crecimiento, EDF; Estado de desarrollo de la flor, NS; No significancia, * $p \leq 0.05$; Diferencias significativas, ** $p \leq 0.01$; Diferencias altamente significativas.

Condición de crecimiento (CONC)

En las plantas, el análisis de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) por CONC; campo e invernadero, muestra que en campo presentan los contenidos más altos de CFT y FT con una media de 109.63 mg EAG g⁻¹ MS y 110.07 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. En relación al crecimiento en invernadero de 78.49 mg EAG g⁻¹ MS y 57.29 mg EQ g⁻¹ MS, según corresponde (Figura 1.3A, Anexo). También por CONC entre invernadero-suelo e invernadero-tezontle, se detectó que invernadero-tezontle, aunque en CFT no fue estadísticamente diferente a invernadero-suelo, presenta los contenidos más altos de CFT y FT con una media de 81.88 mg EAG g⁻¹ MS y 83.31

mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. En relación al crecimiento en invernadero-suelo de 78.49 mg EAG g⁻¹ MS y 57.29 mg EQ g⁻¹ MS, según corresponde (Figura 1.3A, Anexo).

En las flores, el análisis de comparación de medias por CONC; campo e invernadero, muestra que las flores que crecieron en campo tuvieron los más altos contenidos de CFT (157.84 mg EAG g⁻¹) y de FT (157.16 mg EQ g⁻¹ MS). Con relación al crecimiento en invernadero de 152.90 mg EAG g⁻¹ y 103.23 mg EQ g⁻¹ MS, según corresponde (Figura 1.4A, Anexo). Para el caso de la condición de crecimiento bajo invernadero-suelo e invernadero-tezontle los contenidos de CFT y FT, mostraron para ambos metabolitos tener diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). En donde la condición de crecimiento invernadero-tezontle tuvo los contenidos más altos de CFT y FT con una media de 155.09 mg EAG g⁻¹ y de 118.00 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente. Con relación al crecimiento en invernadero-suelo de 152.90 mg EAG g⁻¹ MS y 103.23 mg EQ g⁻¹ MS, según corresponde (Figura 1.4A, Anexo).

En *Glicine max* (soya) se ha demostrado que las condiciones de crecimiento, campo e invernadero, influyen significativamente en los contenidos de metabolitos primarios y secundarios (John *et al.*, 2016; John *et al.*, 2017). Al respecto John *et al.* (2016) evaluaron en variedades de soya crecidas en campo (con temperatura promedio de 71°F (21.66 °C) y fotoperiodo natural) e invernadero (con condiciones contraladas, temperatura de 72 °F (22.22 °C) y fotoperiodo con 16 h luz/ 8 h en oscuridad los primeros dos meses, y en el comienzo de la floración fue de 12 h luz/ 12 h oscuridad) los contenidos de flavonoides como las isoflavonas (daidzina, genistina, gliciteína, daidzeína, genisteína) las cuales no presentaron una tendencia de contenidos constante entre las variedades cultivadas en condiciones de campo e invernadero, sin embargo, 7 de 9 variedades crecidas en invernadero mostraron mayores rendimientos del total de isoflavonas a diferencia de campo. También John *et al.* (2017) demostraron que en las semillas de soya bajo invernadero tuvieron una alta acumulación de proteínas e isoflavonas comparada con las semillas crecidas en campo. Sin embargo, aunque el trabajo se realizó en dos condiciones de crecimiento, sólo mencionan que el experimento en invernadero tuvo condiciones de fotoperiodo y temperatura controladas similares a las condiciones obtenidas de campo (sin referir los datos). En esta investigación las condiciones de crecimiento en invernadero no fueron controladas, por lo cual posiblemente, los contenidos de CFT y FT fueron superiores en campo respecto a los de invernadero, además las diferencias también pueden ser atribuidas al tipo de tejido analizado, ya que en el estudio se están evaluando plantas y flores, y no el grano (soya) como lo realizaron John *et al.* (2016) y John *et al.* (2017).

Durante el crecimiento de la planta la acumulación de compuestos fenólicos puede estar influenciados por ciertos factores ambientales como pueden ser la temperatura, la radiación UV, la fertilización, entre otros. Al respecto Julkunen-Tiitto *et al.* (2015) en su revisión documentan como los flavonoides responden a la radiación UV, ya que los contenidos de estos compuestos dependen de la temporada o la hora del día en que incide la radiación, dado que los compuestos de protección UV están relacionadas con la necesidad de una mayor defensa de la planta al mediodía. Al igual se ha demostrado que con base en los niveles de radiación UV-B que incide en las plantas de maíz (*Zea mays*) se pueden acumular cierto tipo de flavonas en las hojas que absorben la radiación UV (Casati y Walbot, 2005). Posiblemente en este experimento por causa de la radiación solar, se acumuló un contenido mayor de compuestos fenólicos en las plantas y en las flores cultivadas en campo a diferencia de las cultivadas en invernadero, dado a que la cubierta de plástico que cubre el invernadero tiene un 20 % de sombreo, teniendo una reducción de la trasmisión de luz al cultivo. También se ha demostrado que en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. Suzanne) hay un efecto sinérgico entre diferentes parámetros ambientales de temperatura, condiciones de luz, y solución nutritiva, para la acumulación de cierto tipo de flavonoides. En donde las antocianinas se encontraron mayormente en temperaturas de crecimiento de 12 a 18 °C, los niveles de flavonoles aumentaron cuando la intensidad de luz aumento de 100 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el nitrógeno proporcionado mejoró los niveles de flavonoides y derivados de cafeoil (Løvdal *et al.*, 2010). Así que una mayor intensidad de luz y temperaturas no tan altas, juegan un papel crucial para la síntesis de flavonoides. Esto mismo se observó en el estudio, ya que en la condición de campo se obtuvo un mayor contenido de estos metabolitos, dado a que las temperaturas máximas durante el desarrollo de la planta fueron de 23 – 25 °C (Cuadro 1.2A, Anexo) y la intensidad de luz fue mayor a lo obtenido en invernadero. Mientras que en invernadero se tuvo temperaturas máximas de 31 – 38 °C (Cuadro 1.2A, Anexo) y la intensidad de luz fue de 20 % menos a la obtenida en campo, provocando la reducción de estos metabolitos.

El incremento del contenido de CFT y FT en las plantas y flores de haba sembradas en invernadero-tezontle en comparación con las sembradas en invernadero-suelo, posiblemente pudo deberse al uso de solución nutritiva, ya que ambas siembras tuvieron las mismas condiciones ambientales excepto que una se regó con solución nutritiva (Steiner) y la otra solo con agua potable. Además, se ha demostrado que el sistema de hidroponía, puede ser una opción para la obtención de concentraciones mayores de compuestos bioactivos (CB). Sinkovič *et al.* (2017) midieron CB en

hojas de cultivares de achicoria (*Cichorium intybus* L.) fertilizadas con diferentes soluciones nutritivas de nitrógeno (+N), +N en potasio (+N/K) y +N/K enriquecido en fosforo (+N/P/K) al 1, 2 y 3 %. Encontraron que altos contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides se obtuvieron con la solución enriquecida con K, seguida de N y P.

Método de procesamiento (METP)

En las plantas en la CONC campo e invernadero, los resultados de comparación de medias de CFT presentaron que por MTDP no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los secados por estufa (92.81 mg EAG g⁻¹ MS) y el liofilizado (95.32 mg EAG g⁻¹ MS) (Cuadro 1.5). Para FT se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por MTDP, siendo que el secado por estufa presentó el contenido más alto con 91.90 mg EQ g⁻¹ MS. En la CONC invernadero-suelo e invernadero-tezontle en CFT y FT se presentaron diferencias significativas por MTDP en donde el contenido mayor para ambos fitoquímicos se presentó en los liofilizados con 94.05 mg EAG g⁻¹ MS y 79.10 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente (Cuadro 1.5). En el Anexo 1A en la Figura 1.5A y 1.6A se representa la interacción de MTDP*CONC (tratamiento x ambiente), en donde se aprecian los contenidos de los CFT y FT en plantas de *V. faba* bajo condiciones distintas de crecimiento, además de la comparación de medias entre los métodos de procesamiento evaluados.

Cuadro 1.5 Comparación de medias de Tukey por método de procesamiento de compuestos bioactivos en plantas de *Vicia faba* L.

| MTDP | Campo e Invernadero | | Invernadero-suelo e invernadero-tezontle | |
|--------------------|---------------------|----------|--|----------|
| | CFT | FT | CFT | FT |
| Plantas | | | | |
| Estufa | 92.812a | 91.904a | 66.331b | 61.516b |
| Liofilizado | 95.320a | 75.472b | 94.052a | 79.103a |
| DMS | 5.25 | 5.21 | 4.18 | 5.52 |
| Flores | | | | |
| Estufa | 154.552b | 137.973a | 155.251a | 116.849a |
| Liofilizado | 156.192a | 122.426b | 152.751b | 104.391b |
| DMS | 1.47 | 9.48 | 1.04 | 5.91 |

MTDP: Método de procesamiento. CFT: Compuestos fenólicos totales (mg EAG g⁻¹ MS), FT; Flavonoides totales (mg EQ g⁻¹ MS), DMS: diferencia mínima significativa. Medias con la misma letra por columna, no son significativamente diferentes.

En flores, la comparación de medias de CFT y FT de la condición de crecimiento campo e invernadero, mostró que por MTDP tuvo diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en donde para CFT los contenidos más altos se encontraron en liofilizado (156.19 mg EAG g⁻¹MS) y para FT se presentó en los deshidratados por estufa (137.97 mg EAG g⁻¹MS) (Cuadro 1.5). En la CONC invernadero-suelo e invernadero-tezontle en CFT y FT se tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por MTDP, siendo que los contenidos más altos para ambos metabolitos se presentaron en el secado por estufa con 155.25 mg EAG g⁻¹MS y 116.84 mg EQ g⁻¹MS, respectivamente (Cuadro 1.5). En el Anexo 1A en la Figura 1.7A y 1.8A se representa la interacción de MTDP*CONC (tratamiento x ambiente), en donde se aprecia gráficamente los contenidos de los CFT y FT en flores de *V. faba* bajo condiciones distintas de crecimiento, además de la comparación de medias entre los métodos de procesamiento evaluados.

Para identificar de una mejor manera el efecto del MTDP sobre los fitoquímicos analizados, en las Figuras 1.5 y 1.6 se presenta gráficamente la comparación de medias por MTDP del contenido de CFT y FT de las plantas a los 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) (Figura 1.5) o estado de desarrollo de la flor (Figura 1.6) en campo, invernadero-suelo e invernadero-tezontle. De esta forma se aprecia un patrón, en donde las plantas cultivadas en campo ya sea para CFT o FT tuvieron un contenido mayor de estos fitoquímicos con el secado en estufa, además que los contenidos de ambos fitoquímicos fueron superiores a los presentados en invernadero. Sin embargo, con las plantas sembradas en invernadero se apreció que la liofilización fue mejor para estos fitoquímicos, ya que en invernadero-suelo se obtuvo un contenido mayor de CFT y FT en las plantas de 15 y 20 DDE, y en el caso de invernadero-tezontle los contenidos de CFT y FT fueron mayores en cualquier edad de las plantas (10, 15 y 20 DDE) (Figura 1.5). Por desarrollo de la flor, en FA se presentó un patrón contrario a lo obtenido en plantas, ya que los secados en estufa conservaron los CFT y FT en las FA obtenidas en invernadero-suelo e invernadero-tezontle, mientras que en campo se obtuvo un contenido mayor con el liofilizado. Sin embargo, BF no presentó tal patrón. Los contenidos obtenidos de CFT ya sea en BF o FA son superiores a los encontrados en flores medicinales silvestres (*Crataegus monogyna*, *Cytisus multiflorus*, *Malva sylvestris* y *Sambucus nigra*) que ronda de 5 – 55 mg g⁻¹MS y son especies que se utilizan tradicionalmente en la Península Ibérica por tener varias aplicaciones medicinales (Barros *et al.*, 2012).

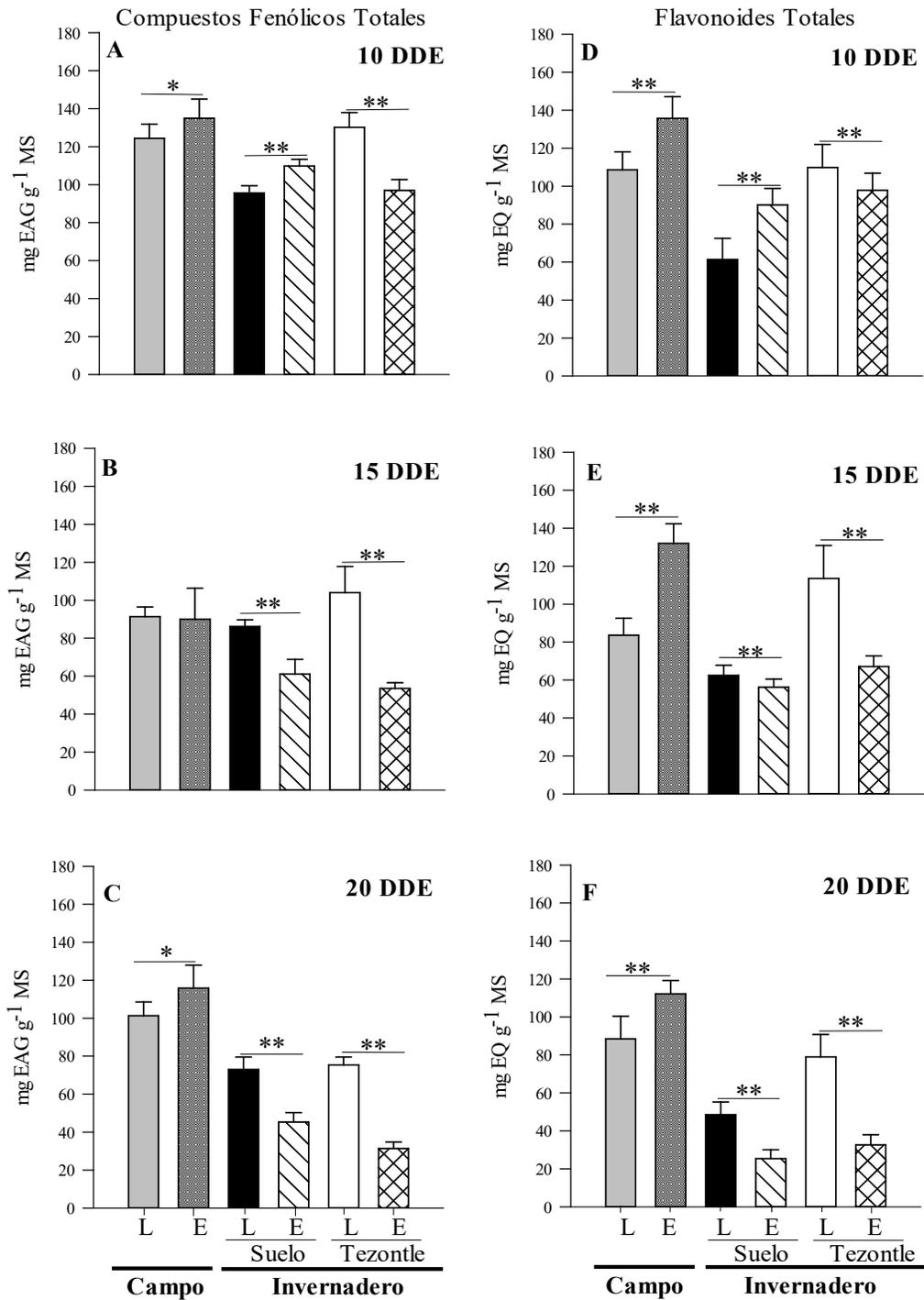


Figura 1.5 Compuestos fenólicos totales (A-C) y flavonoides totales (D-F) en plantas de *Vicia faba* L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) bajo diferentes condiciones de crecimiento: campo, invernadero-suelo (SUE) e invernadero-tezontle (TEZ) y métodos de procesamiento: liofilizado (L) y estufa (E). Entre métodos de procesamiento, ** $p \leq 0.01$; diferencias altamente significativas. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

Flores comestibles como *camellia*, *rose* y *rosselle*, contienen abundantes compuestos bioactivos que proporcionan beneficios a la salud, en donde principalmente se tuvo contenidos altos de CFT en rose de 129.0 – 198.4 mg EAG g⁻¹ MS, seguido de camellia con 56.7 – 107.6 mg EAG g⁻¹ MS y roselle de 28.9 – 43.1 mg EAG g⁻¹ MS (Trinh *et al.*, 2018). Por lo que las flores o los brotes de *V. faba* por los valores que tienen de CFT 151.77 – 159.58 mg EAG g⁻¹ MS y FT 111.28 – 195.66 mg EQ g⁻¹ MS (independientemente de la condición de crecimiento y el método de secado), también podrían ser propuestas como flores comestibles con alto valor de compuestos bioactivos.

En BF se aprecia que CFT en campo no presentó diferencias significativas por MTDP ($p \leq 0.01$), a diferencia de los BF crecidos en invernadero-suelo e invernadero-tezontle. En el caso de FT solo se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en los tratamientos campo e invernadero-suelo, en donde el secado con estufa presentó los contenidos más altos con 195.66 y 132.28 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente (Figura 1.6). En el estado de desarrollo de la flor en FA en CFT se tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en todas las condiciones de crecimiento, siendo en la condición de crecimiento de campo que se encontró el mayor contenido con el MTDP liofilizado (162.56 mg EAG g⁻¹ MS) (Figura 1.6). En FT, solo campo e invernadero-suelo presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$), en donde el contenido mayor de estos metabolitos se detectó con el MTDP de liofilizado (154.06 mg EQ g⁻¹ MS) y estufa (155.41 mg EQ g⁻¹ MS), respectivamente (Figura 1.6). Los resultados presentes en plantas, brotes florales y flores abiertas muestran que los contenidos no sólo difieren de la condición de crecimiento o el MTDP, sino también por el tejido evaluado en *V. faba*, lo cual pudo deberse al tipo y al contenido de metabolitos presentes en los diferentes tejidos a través del desarrollo de la planta, así como sucede con el patrón de acumulación de compuestos fenólicos en los tejidos de la planta de *Camellia Sinensis* (Jiang *et al.*, 2013).

Existen evidencias de que el tipo de procesamiento al que se somete el material vegetal influye en el contenido de compuestos bioactivos como en los CFT y FT (Boukhanouf *et al.*, 2016; Alruwaih y Yaylayan, 2017). Al respecto en ciertas especies como en las hojas de *Eruca sativa* (rúgula), se evaluaron los contenidos de CFT y de FT con dos métodos de secado: liofilización (-40 a -50°C, a una presión de 0.7 Pa) y el secado por estufa con aire (55°C, 6-7 h). En el caso de CFT, el liofilizado (8.67 g 100 g⁻¹ EQ) y el secado (8.5 g 100g⁻¹ EQ) no presentaron diferencias significativas, mientras que en FT si hubo diferencias significativas entre los tipos de secado, en donde liofilizado tuvo un contenido mayor (3.29 g 100 g⁻¹ EQ) a diferencia del secado con estufa (2.42 g 100g⁻¹ EQ) (Alruwaih y Yaylayan, 2017). Se atribuye a que la mayoría de los flavonoides difieren en su

termoestabilidad, así que la destrucción de flavonoides varía con los tratamientos de secado, siendo la liofilización el método que menos los destruye. Además de que con liofilización se logra una mejor eficiencia en la extracción por los cristales de hielo que se forman, los cuales rompen las estructuras celulares y liberan los componentes, consiguiendo una mejor accesibilidad en la extracción del compuesto (Alruwaih y Yaylayan, 2017). Esto no ocurrió en la investigación ya que como se aprecia en la Figura 1.5 y 1.6 en los contenidos de CFT y FT si se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre los MTDP estufa y liofilizado, además de que, no en todas las condiciones de crecimiento el secado por liofilizado tuvo los contenidos mayores de FT. Lo anterior pudo deberse a que en el estudio se trabajó el secado con estufa con una temperatura menor (38 °C) a la que el autor utilizó (55 °C), por lo que la temperatura pudo haber influido en el contenido de estos compuestos bioactivos. También en la especie *Vitis vinifera* L. se evaluó el contenido de CFT con diferentes métodos de secado: estufa (60 °C, durante 17 h), liofilizado (-110 °C, durante 48 h) y secado al sol (durante 7 días), en donde el método de liofilizado (19.83 mg/g MS) no mostró diferencias significativas con respecto al fresco (20.21 mg g⁻¹ MS), en comparación con los otros métodos (Çoklar y Akbulut, 2017). Sin embargo, hay que considerar que el secado por estufa lo hicieron con una temperatura superior (60 °C) a la temperatura utilizada en el estudio (38 °C). Con base en el trabajo de los autores Alruwaih y Yaylayan (2017) y Çoklar y Akbulut (2017) se infiere que el secado en liofilización conserva mejor a los CFT y FT. Esto mismo sucedió con las plantas obtenidas en invernadero sembradas en suelo y en tezontle, mientras que en campo ocurrió lo contrario, ya que el secado en estufa conservó mejor a los CFT y FT. Lo que sugiere que los tipos de CFT y FT acumulados en cada condición de crecimiento pueden ser diferentes, ya que por haber estado el cultivo en campo abierto, y no protegido como en un invernadero, se presenta una mayor incidencia de radiación UV, que promueven la síntesis de flavonas (Casati y Walbot, 2005) o flavonoles (Løvdaal *et al.*, 2010), o también por la temperatura presentada durante el desarrollo de la planta (temperaturas medias 13.87 - 18.64 °C y temperaturas máximas de 23 - 25 °C, Cuadro 1.2A, Anexo) las cuales rondaron entre los 12 - 18 °C que es como se promueven la síntesis de antocianinas (Løvdaal *et al.*, 2010). Lo cual sugiere que el tipo y abundancia de fitoquímicos que se obtienen en cada condición de crecimiento (campo e invernadero) pudieron haber sido sensibles o tolerantes a bajas o altas temperaturas como las que se utilizan en el secado por liofilización o en estufa, respectivamente.

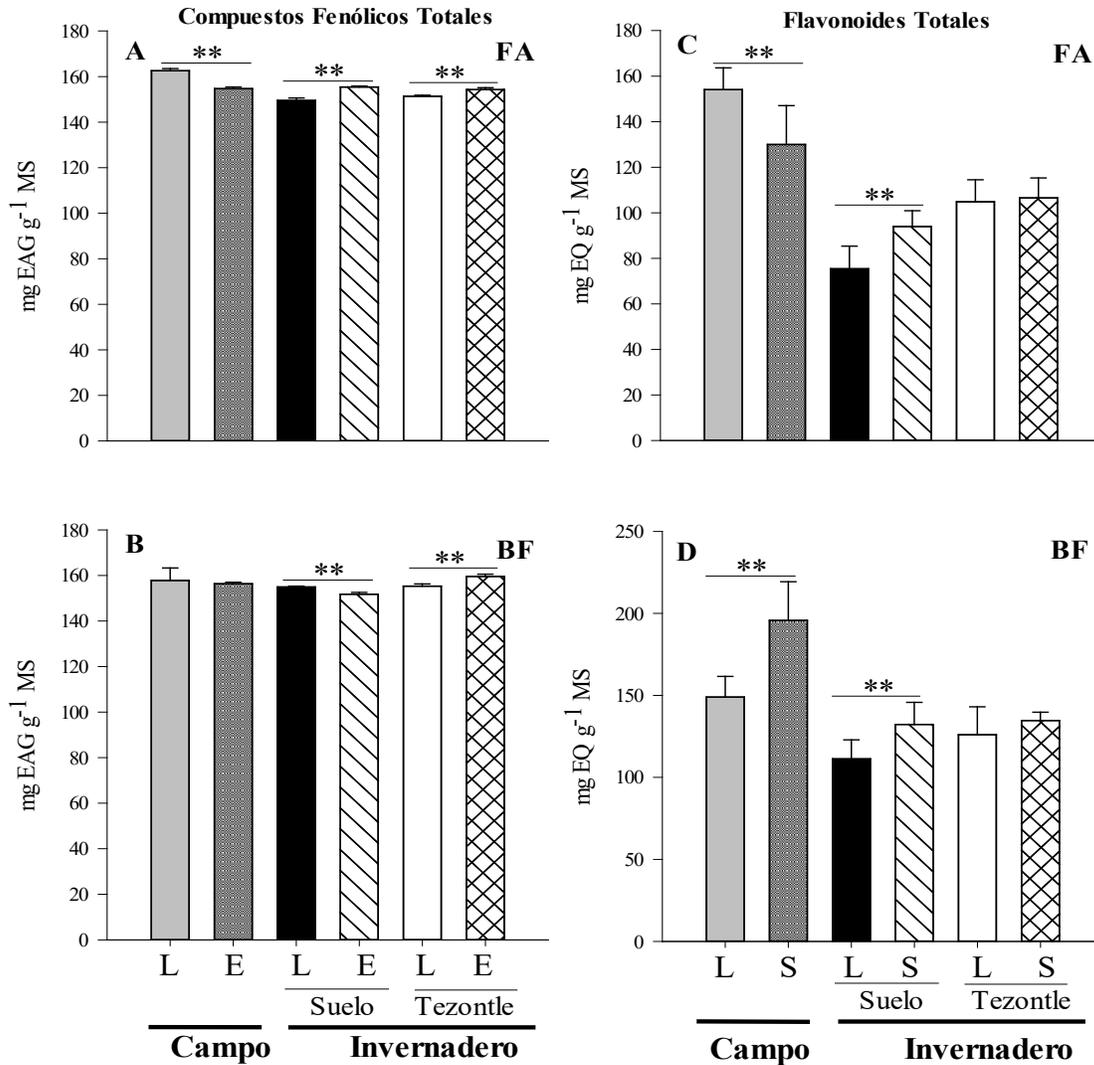


Figura 1.6 Compuestos fenólicos totales (A y B) y flavonoides totales (C y D) en brotes florales (BF) y flores abiertas (FA) de *Vicia faba* L. bajo diferentes condiciones de crecimiento: campo, invernadero-suelo (SUE) e invernadero-tezontle (TEZ) y métodos de procesamiento: liofilizado (L) y estufa (E). Entre métodos de procesamiento, $**p \leq 0.01$; diferencias altamente significativas. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

De acuerdo a lo documentado por Julkunen-Tiitto *et al.* (2015), mencionan que el método de secado por liofilización ayuda a conservar a los FT. Sin embargo, las condiciones de almacenamiento del material vegetal son importantes, ya que puede afectar tanto la concentración de flavonoides como el perfil de flavonoides, por lo que el contenido de agua debe ser lo más bajo posible. Cascaes *et al.* (2018) menciona que un contenido bajo de humedad es necesario para inactivar la enzima polifenol oxidasa, enzima responsable de la degradación de compuestos fenólicos. Temperaturas

alrededor de 60 °C en comparación a las de 40 y 50 °C fue la temperatura más adecuada para el secado por convección en uva "Pinot Noir". Esta temperatura ayudó a inactivar la acción de la enzima polifenol oxidasa, además que contribuyó a la reducción de 86.13 % de la actividad de agua (de 0.971 a 0.135 a_w), lo cual pudo haber influenciado en la inactivación de la actividad enzimática y la aparición de reacciones químicas, reteniendo de esta manera a los compuestos fenólicos (Cascaes *et al.*, 2018). Por lo que es necesario que en el material vegetal después de procesamiento tenga un contenido de agua final bajo para la conservación de los compuestos bioactivos.

Plantas y flores de *Vicia faba* L.

En las plantas el análisis de medias del contenido de CFT respecto a los DDE, mostró que las plantas sembradas tanto en campo como en invernadero independientemente del MTDP, mantuvieron el contenido más alto a los 10 DDE y fue estadísticamente diferente a los demás ($p \leq 0.05$). Contenido que comenzó a descender a partir de esa fecha (Figura 1.7 A). En el estudio realizado por Randhir y Shetty (2003) encontraron que en plantas de haba de 12, 16 y 20 DDE, el contenido más alto de CFT se presenta a los 16 días con una concentración de 21 mg g⁻¹ de materia fresca, valor aproximadamente cinco veces menor a lo obtenido en este trabajo a los 10 DDE en campo y en invernadero (129.69 y 102.70 mg EAG g⁻¹ MS, valor promedio independientemente del MTDP, respectivamente), aun cuando los autores utilizaron elicitores naturales en las semillas de haba para estimular la síntesis de estos metabolitos secundarios. Posiblemente el incremento de CFT se debió a que los autores trabajaron con materia fresca a diferencia de este estudio que los resultados se obtuvieron en materia seca. En la comparación de medias del contenido de FT de plantas sembradas en campo e invernadero, también presentaron una tendencia descendente, sin embargo, esta no comenzó necesariamente después de los 10 DDE, ya que en algunas muestras fue a partir de los 15 DDE (Figura 1.7 B). En relación a la CONC se puede apreciar en la Figura 1.7 que independientemente del MTDP los contenidos mayores de ambos compuestos bioactivos (CFT y FT) se encontraron en campo.

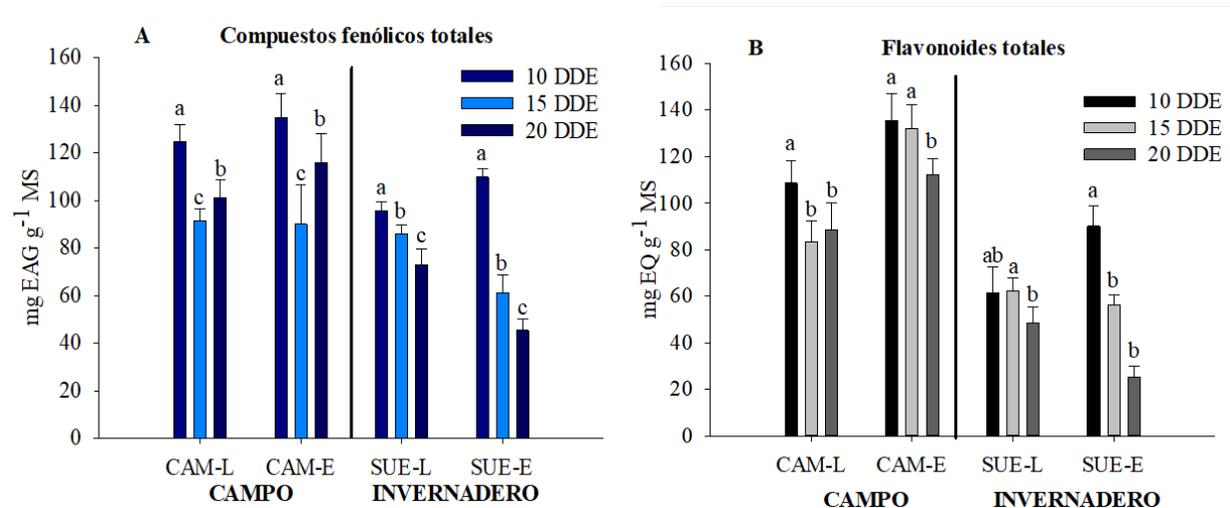


Figura 1.7 Contenido de Compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de *Vicia faba* L. de diferentes días de emergencia (DDE), bajo condiciones distintas de crecimiento; campo e invernadero, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por DDE y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

Respecto a la CONC invernadero-suelo e invernadero-tezontle el análisis de comparación de medias del contenido de CFT en las plantas de haba respecto a los DDE mostró que, independientemente del MTDP las plantas tuvieron el contenido más alto de CFT a los 10 DDE y fue estadísticamente diferente a los demás ($p \leq 0.05$). Después de los 10 DDE se aprecia que el contenido en las plantas tiene una tendencia descendente (Figura 1.8). Al igual con respecto al contenido de FT también se puede ver una tendencia descendente, sin embargo, está inicio entre los 10 y 15 DDE (Figura 1.8). En la Figura 1.8 se puede apreciar que independientemente del MTDP los contenidos mayores de ambos compuestos bioactivos (CFT y FT) se encontraron en invernadero-tezontle.

Algunos trabajos documentan que en haba verde completa (testa + cotiledón) de diferentes variedades de *Vicia major* y *Vicia minor* se obtuvieron contenidos de CFT de 30.93 y 42.44 mg g⁻¹ MS de equivalente de catequina, respectivamente. En el caso de FT los contenidos fueron 0.11 y 0.14 mg g⁻¹ MS de equivalente de quercetina de *V. major* y *V. minor*, respectivamente (Boudjou *et al.*, 2013). Mientras que, en haba madura, en el trabajo de Boukhanouf *et al.* (2016) encontraron que en CFT hay una reducción aproximadamente de 67 % de haba inmadura a haba madura (12 mg EAG g⁻¹ MS) y de FT la reducción es de 73.25 % (0.167 mg EQ g⁻¹ MS). Con base en la

literatura se puede argumentar que en haba, ya sea en haba verde (fresca) o en haba madura (seca), los contenidos de CFT fueron aproximadamente tres veces menores y en FT tienen contenidos muy escasos (592 veces menos) (valores medios: 28.45 mg EAG g⁻¹ MS y 0.13 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) en comparación con los valores de las plantas de haba obtenidos en este estudio (valores medios: 87.12 mg EAG g⁻¹ MS y 76.99 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) independientemente de la condición de crecimiento; campo, invernadero-suelo e invernadero-tezontle, y bajo cualquier método de secado; liofilizado o estufa.

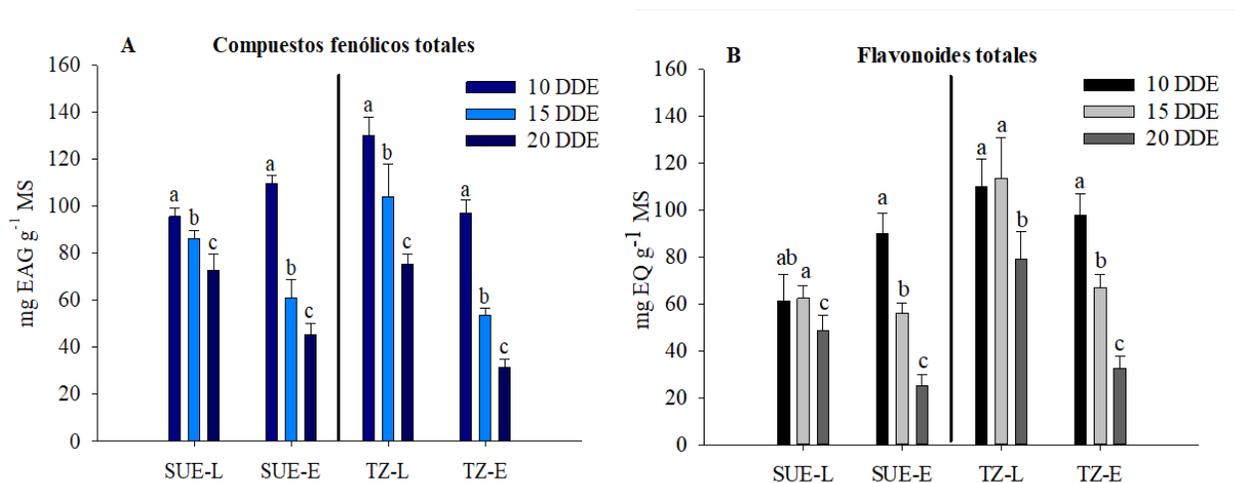


Figura 1.8 Contenido de Compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de *Vicia faba* de diferentes días de emergencia (DDE), bajo condiciones distintas de crecimiento; *invernadero-suelo* e *invernadero-tezontle*, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por DDE y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

En flores, el análisis de comparación de medias del contenido de CFT en los BF y en las FA mostró que, en campo el MTDP liofilizado no presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los dos estados de desarrollo de la flor; mientras que, en estufa si hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) siendo en los BF en donde se presentó el contenido más alto (156.34 mg EAG g⁻¹ MS) (Figura 1.9). En invernadero en ambos MTDP hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), donde el BF tuvo el contenido más alto (154.92 mg EAG g⁻¹ MS) en la condición de SUE-L y para SUE-E fue en FA (155.41 mg EAG g⁻¹ MS) (Figura 1.9). En FT, los BF y FA presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los MTDP, en donde la condición de CAM-E presentó el contenido más alto en BF con una media de 195.66 mg EQ g⁻¹ MS (Figura 1.9). En relación con la CONC se puede apreciar

que independientemente del MTDP los contenidos mayores de ambos compuestos bioactivos (CFT y FT) se encontraron en campo (Figura 1.9).

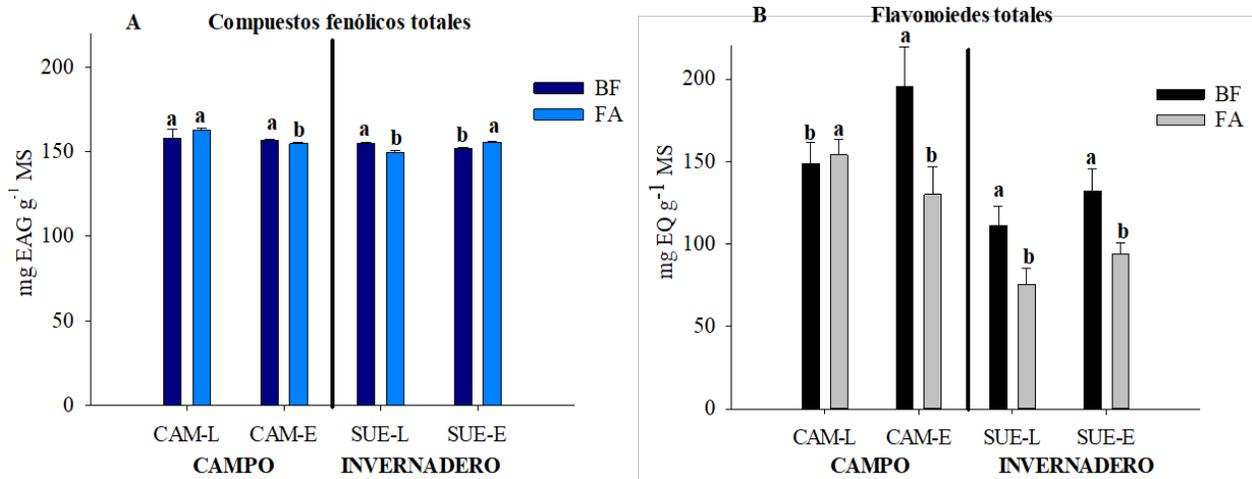


Figura 1.9 Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de *Vicia faba* L.; brotes florales (BF) y flores abiertas (FA), bajo condiciones distintas de crecimiento; campo e invernadero y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por estado de desarrollo de la flor (BF y FA) y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

Respecto a la CONC invernadero, los análisis de comparación de medias del contenido de CFT y FT en los BF y FA presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en donde los contenidos más altos de CFT se detectaron en SUE-L en los BF (154.92 mg EAG g⁻¹ MS) en SUE-E en las FA (155.41 mg EAG g⁻¹ MS), en TEZ-L y TEZ-E en BF (155.27 Y 159.58 mg EAG g⁻¹ MS, respectivamente). En el caso de FT independientemente del MTDP se aprecia claramente que en BF se encontró el mayor contenido (Figura 1.10).

Aunque las plantas y las flores no son consumidas comúnmente, pueden ser una fuente alternativa de extracción de CF para suplementos y/o productos funcionales, no sólo de CF en general, sino de compuestos bioactivos particulares que la planta de haba contiene como son: L-Dopa, isoflavonas, entre otros, que se ha comprobado y documentado que tienen un efecto beneficioso en la salud (Setchell y Cassidy, 1999; Apaydin *et al.*, 2000; Lampe, 2009).

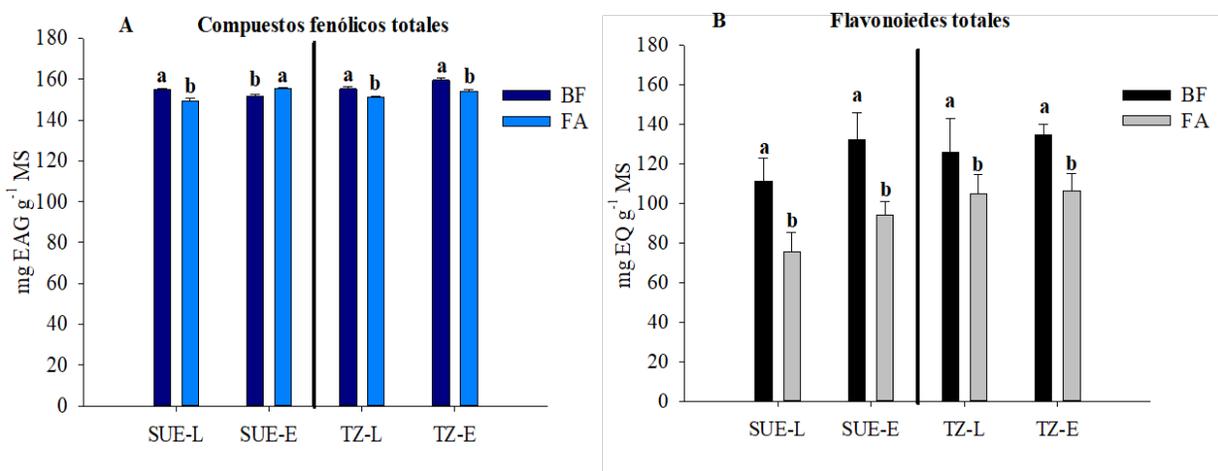


Figura 1.10 Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de *Vicia faba* L.; brotes florales (BF) y flores abiertas (FA), bajo condiciones distintas de crecimiento; invernadero-suelo e invernadero-tezontle, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por estado de desarrollo de la flor (BF y FA) y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 8$).

Aprovechamiento de compuestos fenólicos y flavonoides totales en plantas y flores de *Vicia faba* L.

Los estudios en donde se evalúa la condición de crecimiento y el método de procesamiento sobre los contenidos de compuestos bioactivos de una especie son escasos, como en el caso de la especie *V. faba*. Así que este estudio evidenció los contenidos de CFT y FT en plantas de diferente día después de la emergencia (10, 15 y 20 DDE) y también en flores de diferente estado de desarrollo (BF y FA), además de conocer la influencia que tiene en los tejidos de *V. faba* la condición de crecimiento en campo invernadero-suelo e invernadero-tezontle, y el método de secado por liofilización o estufa, sobre estos compuestos bioactivos.

Con base en los resultados se demostró que la condición de crecimiento, así como el método de secado influyen en el contenido de CFT y FT presentes en los tejidos del haba, por lo que es indispensable evaluar estos factores además de los tejidos para poder conocer de qué manera se puede obtener un contenido mayor de estos compuestos bioactivos y ser aprovechados por el ser humano por su capacidad antioxidante y sus beneficios en la disminución y/o prevención de enfermedades. Además por su alto contenido se infiere que pueda tener una gran cantidad de algunos fitoquímicos en particular, que han demostrado tener un efecto específico en la salud como

es el caso de la L-Dopa e isoflavonas, fitoquímicos que son utilizados como tratamiento en el mal de Parkinson y para la prevención de algún tipo de cáncer, respectivamente.

Aunque las plantas y las flores de *V. faba* hasta la fecha no son consumidas comúnmente, pueden ser tejidos propuestos para ser aprovechados para la obtención de extractos a fin de usarlos en productos funcionales, nutracéuticos, o para el desarrollo de fármacos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades. Por lo que, si se quisiera aprovechar los compuestos bioactivos obtenidos de los tejidos de la planta de *V. faba*, se recomendaría utilizar las plantas, ya que con base en los resultados del trabajo. Aunque las flores tuvieron contenidos mayores de CFT y FT, la obtención de plantas es más rápida que la de las flores. Sin embargo, sería adecuado evaluar en los tejidos los rendimientos de estos fitoquímicos para valorar el tejido que realmente convenga obtener para la extracción de estos compuestos bioactivos. Además de evaluar los factores agroambientales (luminosidad, temperatura, humedad relativa, etc.) que estén interviniendo en el desarrollo de *V. faba* para conocer la influencia que tienen en la síntesis de estos fitoquímicos importantes en la planta y para la salud del ser humano.

1.4 Conclusiones

Los hallazgos del estudio revelaron que las condiciones de crecimiento en la que se desarrolló la planta de haba y el método de procesamiento utilizado en los tejidos, influyeron significativamente en el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT). En campo se presentaron los contenidos más altos de CFT y FT en las plantas y en las flores en comparación con invernadero. Mientras que, dentro de invernadero, invernadero-tezontle tuvo los contenidos más altos de CFT y FT en comparación con invernadero-suelo. El secado en estufa conservo mayormente a los CFT y FT de los tejidos obtenidos en campo, y liofilización conservo mejor a los obtenidos en invernadero. Los resultados de ambos compuestos fenólicos en las plantas tuvieron una tendencia decreciente constante de las plantas más jóvenes (10 días después de la emergencia (DDE)) a las más adultas (20 DDE) independientemente de la condición de crecimiento y método de procesamiento. Los contenidos de los compuestos no fueron superiores a lo obtenido en las flores de haba, principalmente cuando las flores se encuentran en botón. Con base en los resultados para la obtención de CFT y FT en *V. faba*, se recomienda sembrar bajo la condición de crecimiento en campo, obtener plantas de 10 DDE, y procesarlas con secado en estufa a 38 °C.

1.5 Literatura citada

- Alruwaih N., V. A. Yaylayan. 2017. Comparative evaluation of bioactive compounds in lyophilized and tray-dried rocket (*Eruca sativa*). *Journal of Food Process Preservation*. 41: e13205.
- Apaydin H., S. Ertan, S. Özekmekçi. 2000. Broad Bean (*Vicia Faba*)—A Natural Source of L-Dopa—Prolongs “On” Periods in Patients With Parkinson’s Disease Who Have “On–Off” Fluctuations. *Movement Disorder Society*. 15: 163-179.
- Baginsky C., Á. Penã-Neira, A. Cáceres, T. Hernández, I. Estrella, H. Morales, R. Pertuzé. 2013. Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 1-6.
- BBCH, Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry. 2018. Growth stages of mono-and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. Meier U. Julius Kühn-Institut (JKI) Quedlinburg: Germany. pp: 37-41.
- Barros L., M. Dueñas, A. M. Carvalho, I. C.F.R. Ferreira, C. Santos-Buega. 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 1576-1582.
- Bobo-García G., G. Davidov-Pardo, C. Arroqui, P. Vírveda, M. R. Marín-Arroyo, M. Navarro. 2015. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 204–209.
- Boudjou S., B. Dave O., F. Zaidi, F. Hosseinian. 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 138: 1543–1550.
- Boukhanouf S., H. Louaileche, D. Perrin (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.
- Casati P., V. Walbot. 2005. Differential accumulation of maysin and rhamnosylisoorientin in leaves of high-altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant, Cell and Environment*. 28: 788–799.
- Cascaes T. A. S., D. W. Hidalgo C., F. dos Santos G., L. M. Corrêa C., R. Valeriano T. 2018. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. *Brazilian Journal of Food Technology*. 21:1-8.
- Çoklar H., M. Akbulut. 2017. Effect of Sun, Oven and Freeze-Drying on Anthocyanins, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Black Grape (Ekşikara) (*Vitis vinifera* L.). *South African Journal for Enology and Viticulture*. 38:264:272.
- Corona-Jiménez E., N. Martínez-Navarrete, H. Ruiz-Espinos, J. Carranza-Concha. 2015. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia* 50: 403-412.
- Chaieb, N., J. L. González, M. López-Mesas, M. Bouslama, M. Valiente. 2011. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International* 44: 970-977.

- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua Servicio Meteorológico Nacional. 2019. Información Estadística Climatológica. En <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica>. Consultada el 3/diciembre/2019.
- Drago S. M. E., M. López L., T. R. Sainz, E. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37: 58-68.
- Ehringer H., O. Hornykiewicz. 1998. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism and Related Disorders*. 4: 53-57.
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141.
- Farasat M., Ramazan-Ali Khavari-Nejad, S. M. Bagher N., F. Namjooyan. 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13 (1): 163-170.
- Fernandes D. J. A., M. R. Ferreira A., K. Randau P., T. Souza P., L. A. Soares L. 2012. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *The Scientific World Journal*. Article ID 923462, 1-7. doi:10.1100/2012/923462
- Gimeno C. E. 2004. Compuestos fenólicos un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista de la oficina de farmacia (OFFARM)* 23: 80-84.
- Herald T. J., P. Gadgil, M. Tilley. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2326–2331.
- Fuentes-Herrera P.B., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, M. L. Luna-Guevara, J. I. Olvera-Hernández. 2020. Quantification of isoflavones in stems of faba bean (*Vicia faba* L.). *Rev FCA UNCUYO*. 52: 43-51.
- Jiang X., Y. Liu, W. Li, L. Zhao, F. Meng, Y. Wang, H. Tan, H. Yang, C. Wei, X. Wan, L. Gao, T. Xia. 2013. Tissue-Specific, Development-Dependent Phenolic Compounds Accumulation Profile and Gene Expression Pattern in Tea Plant [*Camellia sinensis*]. *Phenolic Compounds Accumulation & Gene Expression*. 8: 1 – 14.
- John M. K. M., F. Khan, D. L. Luthria, B. Matthews, W. M. Garrett, S. Natarajan. 2017. Proteomic and metabolomic analysis of minimax and Williams 82 soybeans grown under two different conditions. *Journal of Food Biochemistry* 41:1-8.
- John M. K. M., S. Natarajan, D. L. Luthria. 2016. Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. *Food Chemistry* 211: 347–355.
- Julkunen-Tiitto R., N. Nenadis, S. Neugart, M. Robson, G. Agati, J. Vepsäläinen, G. Zipoli, L. Nybakken, B. Winkler, M. A. K. Jansen. 2015. Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. *Phytochem Reviews*. 14: 273-297.
- Kaufman P. B., A. Duke J., H. Brielmann, J. Boik, J.E. Hoyt. 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *The journal of alternative and complementary medicine* 3:7-12.

- Kirakosyan A., P. B. Kaufman, J. A. Duke, S. Warber, S. Bolling. 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). Evidence-Based Integrative Medicine 1:131-135.
- Lampe J. W. 2009. Is equol the key to the efficacy of soy foods?. The American Journal of Clinical Nutrition 89 (suppl): 1664S–1667S
- Matyushchenko N.V., T. A. Stepanova. 2003. Quantitative determination of the total content of flavonoids in the new phytopreparation elima. Pharmaceutical Chemistry Journal 37(5): 42-44.
- Løvdaal T., K. M. Olsen, R. Slimestad, M. Verheul, C. Lillo. 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. Phytochemistry. 71:605-613.
- Magalhães L. M., M. I. G. S. Almeida, L. Barreiros, S. Reis, Marcela A. Segundo. 2012. Automatic aluminum chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas. Food Analytical Methods 5:530–539.
- Miranda M., P. Chaná. 2000. Severe Off-Period Facial Dystonia in Parkinson's Disease. Movement Disorders 15:163-179.
- Multari S., D. Stewart, W. R. Russell. 2015. Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 14: 511 -522.
- Neugart, S., S. Rohnb, M. Schreiner. 2015. Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in *Vicia faba* and *Pisum sativum* leaves by HPLC-DAD-ESI-MSn and the genotypic effect on their flavonoid profile. Food Research International 76:114-121.
- Pekal, A., K. Pyrzynska. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for flavonoid content assay. Food Analytical Methods 7:1776-1782.
- Trinh L. T. P., Yong-Soo C., Hyeun-Jong B. 2018. Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. Industrial Crops & Products. 125: 261–268.
- Uriarte I.P., M. Isabel C. 2009. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. Fitoterapia 80: 465-467.
- Randhir, R., K. Shetty 2003. Light-mediated fava bean (*Vicia faba*) response to phytochemical and protein elicitors and consequences on nutraceutical enhancement and seed vigour. Process Biochemistry 38: 945-952.
- Turco I., G. Ferretti, T. Baccetti. 2016. Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. Journal of Food and Nutrition Research 55:283-293.
- Santos-Buelga C., S. Gonzalez-Manzano, M. Dueñas, A. M. Gonzalez-Paramas. 2012. Chapter 17, Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology. Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.). Humana Press; Edición: 3rd (Ed) 864:427-464.
- SAS (2002) SAS/STAT User guide, version 9. SAS Institute Inc, North Carolina.
- Setchell K. D. R., A. Cassidy. 1999. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. American Society for Nutritional Sciences 129: 758S- 767S.

- Silva-Beltrán N. P., S. Ruiz-Cruz, L. A. Cira-Chávez, M. I. Estrada-Alvarado, J. J. Ornelas-Paz, M. A. López-Mata, C. L. Del-Toro-Sánchez, J. F. Ayala-Zavala, E. Márquez-Ríos. 2015. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry* ID 284071: 1-10.
- Sinkovič L. J. Hribar, L. Demšar, R. Vidrih, M. Nečemer, P. Kump, D. Žnidarčič. 2017. Bioactive compounds and macroelements of chicory plants (*Cichorium intybus* L.) after hydroponic forcing in different nutrient solutions. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 58:274-281.
- Siqueira-Soares R. D. C., A. R. Soares, A. V. Parizotto, M. de L. L. Ferrarese, O. Ferrarese-Filho. 2013. Root growth and enzymes related to the lignification of maize seedlings exposed to the allelochemical L-DOPA. *The Scientific World Journal*, 2013: ID 134237.
- Steiner A. A. 1984. The universal nutrient solution, proceeding of IWOSC 1984 6th International Congress on Soilless Culture, Wageningen, The Netherlands, April 29 - May 5, 1984. 633 – 650 pp.

CAPÍTULO II: CONTENIDO, CANTIDAD Y APROVECHAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PLANTAS Y FLORES DE HABA (*Vicia faba* L.) BAJO CONDICIONES DISTINTAS DE CRECIMIENTO

Resumen

Los tejidos de la planta de haba pueden ser una fuente natural de obtención de compuestos bioactivos (CB), existen estudios que muestran su efecto terapéutico en enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, enfermedades óseas, en el tratamiento del Parkinson y en la etapa del climaterio de la mujer. La investigación tuvo como primer objetivo conocer en plantas a los 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y en las flores de cuatro variedades mexicanas de haba el contenido y cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y daidzeína (DAID). Además de analizar el efecto que tienen estos compuestos de extractos de plantas y flores, cuando son evaluadas en función de la estructura vegetal, la precocidad del cultivar y en condiciones distintas de crecimiento campo e invernadero. Las variedades se sembraron en campo e invernadero bajo un diseño de bloques completos al azar. En ambas condiciones se midieron variables agroambientales. Se cosecharon las plantas y las flores y se procesaron con liofilización para posteriormente realizar análisis por espectrofotometría UV-visible y HPLC. Los resultados presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$) entre variedad, precocidad, DDE y condición de crecimiento. La variedad Rojita de floración tardía, presentó los contenidos más altos de CFT (121.12 mg EAG g⁻¹ MS), FT (117.18 mg EQ g⁻¹ MS) y L-DOPA (72.92 mg g⁻¹ MS) en las plantas, y en las flores (CFT: 177.7 mg EAG g⁻¹ MS, FT: 183.12 mg EQ g⁻¹ MS, L-DOPA: 102.1 mg g⁻¹ MS). La variedad precoz Matlatzintla presentó el mayor contenido de DAID en plantas (0.394 mg g⁻¹ MS) y flores (0.518 mg g⁻¹ MS). Por edad las plantas de 10 DDE tuvieron los contenidos más altos de CFT (125.52 mg EQAG g⁻¹ MS), FT (99.65 mg EQ g⁻¹ MS) y L-DOPA (82.58 mg g⁻¹ MS), y los de DAID se presentaron a los 20 DDE (0.330 mg EQ g⁻¹ MS). Por estructura, las flores presentaron los contenidos mayores de todos los CB (CFT: 162.01 mg EAG g⁻¹ MS, FT: 165.74 mg EQ g⁻¹ MS, L-DOPA: 92.13 mg g⁻¹ MS, DAID: 0.458 mg g⁻¹ MS) a diferencia de las plantas. Por cantidad las plantas de 20 DDE crecidas en campo mostraron los contenidos más altos de los CB (CFT: 146.80, FT: 141.35, L-DOPA: 108.31 y DAID: 0.833 mg planta⁻¹ MS). Por condición de crecimiento, las plantas crecidas en campo tuvieron los contenidos mayoritarios de CB respecto a los obtenidos en invernadero. El análisis de correlaciones canónicas (ACC) demostró que la luminosidad tuvo una correlación positiva fuerte con DAID, mientras que temperatura y fósforo tuvieron una correlación

inversa con DAID y L-DOPA. Plantas de 20 DAE crecidas en campo podrían ser aprovechadas para la obtención de CB, principalmente aquellos compuestos que tienen un efecto importante como L-DOPA para el mal de Parkinson y DAID para la prevención de algunos tipos de cáncer.

Palabras claves: análisis de correlaciones canónicas, campo, cantidad, invernadero, Parkinson.

Abstract

The tissues of the broad bean plant can be used as a natural source of bioactive compounds (BC), they can prevent cardiovascular diseases, certain types of cancer, bone diseases, they also have a therapeutic effect in the treatment of Parkinson's and reduce discomforts in the climacteric stage of women. The aim of the study was to know the content, quantity and use of total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and daidzein (DAID), in plants at 10, 15 and 20 days after the emergence (DAE) and in flowers of four Mexican broad bean varieties, depending on the plant structure, the precocity and the growth condition. The varieties were sown in field and greenhouse under a randomized complete block design. Agri-environmental variables were measured in both conditions. Plants and flowers were harvested and processed with freeze-drying for subsequent analysis by UV-visible spectrophotometry and HPLC. The results showed significant differences ($p \leq 0.05$ or $p \leq 0.01$) between variety, precocity, DAE and growth condition. The Rojita variety of late flowering, presented the highest content of TPC (121.12 mg GAE g⁻¹ DW), TF (117.18 mg QE g⁻¹ DW) and L-DOPA (72.92 mg g⁻¹ DW) in plants, and in flowers (TPC: 177.7 mg GAE g⁻¹ DW, TF: 183.12 mg QE g⁻¹ DW, L-DOPA: 102.1 mg g⁻¹ DW). The early variety Matlatzintla presented the highest content of DAID in plants (0.394 mg g⁻¹ DW) and flowers (0.518 mg g⁻¹ DW). By age at the 10 DAE plants had the highest contents of TPC (125.52 mg GAE g⁻¹ DW), TF (99.65 mg QE g⁻¹ DW) and L-DOPA (82.58 mg g⁻¹ DW), and DAID were presented at 20 DAE (0.330 mg QE g⁻¹ DW). By structure, the flowers presented the highest contents of all BC (TPC: 162.01 mg GAE g⁻¹ DW, TF: 165.74 mg QE g⁻¹ DW, L-DOPA: 92.13 mg g⁻¹ DW, DAID: 0.458 mg g⁻¹ DW) unlike plants. By quantity, the 20 DAE plants grown in the field display the highest BC contents (TPC: 146.80, TF: 141.35, L-DOPA: 108.31 and DAID: 0.833 mg plants⁻¹ DW). By growth condition, the plants grown in the field had the highest BC contents with respect to those obtained in the greenhouse. Canonical correlation analysis (CCA) showed that luminosity had a strong positive correlation with DAID, while temperature and phosphorus they have an inverse correlation with DAID and L-DOPA. Plants of 20 DAE grown in

the field could be used to obtain BC, mainly those compounds that have an important effect such as L-DOPA for Parkinson's disease and DAID for the prevention of some types of cancer.

Keywords: analysis of canonical correlations, field, greenhouse, Parkinson, quantity.

2.1 Introducción

Vicia faba L. tiene un valor nutritivo y nutracéutico por los compuestos que contiene (Trinidad *et al.*, 2010; Multari *et al.*, 2015; Fuentes-Herrera, 2016), es considerada un cultivo estratégico para alimentar a la creciente población mundial (Multari *et al.*, 2015). Entre los compuestos que tiene se destacan los fitoquímicos que por su función benéfica en el organismo son considerados compuestos bioactivos. Estos componentes ya sean nutrientes o no, proporcionan una o varias funciones fisiológicas específicas beneficiosas en el cuerpo humano (Roberfroid, 1996). En esta especie, entre la diversidad de compuestos bioactivos que se pueden encontrar, están los compuestos fenólicos, los flavonoides, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e isoflavonas.

Los compuestos fenólicos, que incluyen a los flavonoides, tienen entre sus funciones servir de antioxidantes para el ser humano (Gimeno, 2004), los cuales generan un efecto beneficioso en la salud. Al respecto Turco *et al.* (2016) documenta los tipos de compuestos fenólicos presentes en el haba y el efecto protector que podrían tener frente al desarrollo de enfermedades por su acción como antihipertensivo, quimiopreventivo y antidiabético.

L-DOPA se utilizada en el mal de Parkinson. Esta enfermedad es causada por un proceso neurodegenerativo, el cual va afectando al sistema nervioso central. Además, se tienen distintos síntomas como distonía (temblores), discinesia (trastornos del movimiento), bradicinesia (movimientos lentos), inestabilidad de la postura, rigidez muscular, entre otros. La enfermedad no es exclusiva en personas de edad avanzada, al igual se ha presentado en menores de 45 años. Hasta la fecha se desconoce la causa del padecimiento, así como su prevención (Catalán y Rodríguez del Álamo, 2016). Florán-Garduño y Rangel-Baraja (2005) mencionan en su revisión, que L-DOPA actúa como el precursor del neurotransmisor catecolamina, su función es restaurar a la dopamina de la degeneración y muerte de neuronas dopaminérgicas para que el sistema nervioso central se recupere. Por lo que L-DOPA se prescribe como tratamiento para disminuir los síntomas que provoca la enfermedad. La medicación va acompañada con un inhibidor de la descarboxilasa periférica como puede ser benserazida o carbidopa, además de algún otro fármaco que el paciente

consume debido a los trastornos distintos que ocasiona la enfermedad (Miranda *et al.*, 2000). La planta de haba contiene L-DOPA y fue aislada por primera vez por Marcus Guggenheim en 1913 (Ramírez-Moreno *et al.*, 2015), además se conoce que el haba es una de las pocas especies que sintetiza este fitoquímico (Hu *et al.*, 2015), en cantidades altas. La efectividad de esta especie como fuente natural de L-DOPA se evidencia con estudios de caso de pacientes enfermos de Parkinson quienes demuestran que con la ingesta de 250 g de habas hervidas (al menos dos veces al día), junto con su medicación habitual, presenta una reducción de espasmos severos y de distonía que ocasiona la enfermedad (Miranda *et al.*, 2000). Sin embargo, en las plantas de haba se ha comprobado que el contenido de L-DOPA es 20 veces mayor que en el fruto (Vered *et al.*, 1994). También Kirakosyan *et al.* (2004) demuestran con diferentes cultivares de haba, que los contenidos de L-DOPA en las plantas son 20 – 25 veces mayores que en las semillas, sugiriendo que las vías metabólicas para su producción se activan en el desarrollo de la planta (Kirakosyan *et al.*, 2004). Randhir y Shetty (2003) encontraron que, en plantas de haba de 12, 16 y 20 días de crecidas, el contenido mayor de este fitoquímico se presenta a los 16 días con valores de 16.5 g kg⁻¹ de materia fresca (MF). También reportes recientes mostraron que los contenidos de L-DOPA en plantas de 15 días después de la germinación fueron de 13.3 g kg⁻¹ MF (Etemadi *et al.*, 2018) y en las flores de la planta de haba se presentan cantidades importantes de L-DOPA (27.8 - 63.5 g kg⁻¹ MS) (Hu *et al.*, 2015). De acuerdo a Vered *et al.* (1994) el consumo de plantas de haba, mostró un incremento de los niveles de L-DOPA en el plasma de pacientes con Parkinson, con mejorías en sus características motoras de manera similar al que se obtiene cuando el paciente consume el medicamento.

Las isoflavonas son consideradas fitoestrógenos, Křížová *et al.* (2019) mencionan que por su estructura y tamaño molecular se asemejan particularmente con el estrógeno 17 β-estradiol, por lo que son clasificadas entre los compuestos con mayor actividad estrogénica, siendo daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) y genisteína (7,4'-dihidroxi-6-methoxiisoflavona) las isoflavonas mayormente consumidas presentes en la soya (*Glicine max*) y en los productos a base de esta especie. Estos fitoquímicos son utilizados para disminuir los síntomas ocasionados por la menopausia, para mejorar enfermedades óseas (osteoporosis) y como quimiopreventivos en cáncer de próstata y mama (Anderson *et al.* 1999; Křížová *et al.* 2019). Las isoflavonas se sintetizan en el metabolismo secundario de las plantas, en la ruta metabólica de los fenilpropanoides (Yu *et al.*, 2000), siendo la enzima isoflavona sintasa, la que genera el primer paso para la biosíntesis (Jung

et al., 2000). Se encuentran principalmente en la subfamilia de la Fabaceae, la Papilionoideae (Faboideae) (Mazur y Adlercreutz, 1998), en donde se incluyen especies como *Glicine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, entre otras. Aunque comúnmente la soya es consumida por su alto contenido en fitoestrógenos, investigaciones han demostrado que en *V. faba* también se encuentran las isoflavonas daidzeína y genisteína. Al respecto Kaufman *et al.* (1997) demuestran que en el tallo de la planta de haba se pueden encontrar importantes contenidos de isoflavonas, donde daidzeína fue el metabolito predominante. Kirakosyan *et al.* (2004) hallaron diferencias significativas entre los contenidos de isoflavonas en plantas de 24 cultivares de haba de diez días posteriores a su germinación, donde el mayor contenido para daidzeína fue de 13.9 mg kg⁻¹ y 11.6 mg kg⁻¹ para genisteína; aunque en algunos cultivares no se detectó la presencia de alguno de estos metabolitos. Por otro lado, el tallo de cultivares mexicanos de haba de entre seis y siete semanas de emergida la planta se encontraron concentraciones superiores de daidzeína (entre 34.92 - 59.98 mg kg⁻¹) (Fuentes-Herrera, 2016).

Puesto que compuestos bioactivos encontrados en *V. faba* (CFT, FT, L-DOPA y daidzeína) tienen potencial benéfico para la salud, es relevante continuar con investigaciones para poder aprovecharlos. Sin embargo, es necesario considerar que los contenidos de fitoquímicos no son constantes, ya que tienden a variar dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta, de la estructura vegetal utilizada, de las condiciones de crecimiento, de los métodos de procesamiento, de las variedades o genotipos analizados (Cuadro 2.1). Estas variables son importantes considerar en la realización de investigaciones, para obtener resultados estratégicos que puedan ser útiles para la producción de cultivos alimenticios funcionales como lo es *V. faba*. Que además de contener compuestos bioactivos importante por su efecto funcional en el organismo humano, es una de las pocas especies que produce L-DOPA (Hu *et al.*, 2015) y contiene fitoestrógenos (isoflavonas) que particularmente se localizan en la familia de las leguminosas (Fabáceae). Además, en los estudios se debe prestar atención en especificar el órgano y la variación individual de metabolitos secundarios, ya que no en todos los tejidos se encuentran las mismas cantidades y a veces compuestos determinados están en órganos específicos (Hadacek, 2002). Así que la investigación tuvo como primer objetivo conocer en plantas a los 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y en las flores de cuatro variedades mexicanas de haba el contenido y cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y daidzeína. Además de analizar el efecto que tienen estos compuestos de extractos de

plantas y flores, cuando son evaluados en función de la estructura vegetal, la precocidad del cultivar y en condiciones distintas de crecimiento campo e invernadero.

Cuadro 2.1 Citas de investigaciones en *Vicia faba* L. y *Glicine Max* relacionadas con factores que influyen en los contenidos de los compuestos bioactivos (CB).

| Factores CB | Compuestos fenólicos | Flavonoides | L-DOPA | Isoflavonas |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|---|
| Estructura vegetal/ semilla completa o fraccionada | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Hu <i>et al.</i> (2015) | Kaufman <i>et al.</i> (1997) |
| | Boudjou <i>et al.</i> (2013) | Boudjou <i>et al.</i> (2013) | Etemadi <i>et al.</i> (2018) Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) | Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) |
| Condiciones de crecimiento | | | Etemadi <i>et al.</i> (2018) | John <i>et al.</i> (2017) John <i>et al.</i> (2016) |
| Métodos de procesamiento | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Etemadi <i>et al.</i> (2018) | |
| Variedades o variabilidad genética | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Boukhanouf <i>et al.</i> (2016) | Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) | John <i>et al.</i> (2017) John <i>et al.</i> (2016) Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) |

2.2 Materiales y métodos

Material vegetal

Cuatro variedades de habas mexicanas de diferente precocidad donadas por el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), fueron utilizadas en el estudio (Cuadro 2.2).

Siembra del material vegetal bajo condiciones distintas de crecimiento

Las variedades de haba; Rojita, ICAMEX V-31, José María y Matlatzintla, se sembraron bajo un diseño de bloques completos al azar en condiciones distintas de crecimiento (CONC) campo e invernadero.

La siembra en campo se realizó el 20 de febrero del 2018, en la comunidad de San Agustín Calvario de San Pedro Cholula, Puebla (19° 03' 03'' latitud norte, 98° 20' 37'' longitud oeste). Un día antes

de la siembra se humedeció la tierra. Las cuatro variedades fueron sembradas en parcelas de 6 m² (3 x 2 m), con tres semillas por pala (golpe) a una profundidad aproximada de 5 cm, con una distancia de 60 cm entre surcos y de 30 cm entre matas. Cada parcela fue una repetición y se establecieron tres repeticiones por variedad (Figura 2.1 a y a').

Cuadro 2.2 Características de las semillas de haba utilizadas en la investigación.

| Variedad | | Dimensiones (cm) | Floración |
|--------------|---|-------------------|-----------|
| Rojita |  | L= 2.7 A = 1.7 | Tardía† |
| ICAMEX-V31 |  | L= 1.9 A = 1.2 | Precoz†† |
| José María |  | L= 2.5 A = 1.8 | Tardía |
| Matlatzintla |  | L= 1.7 A = 1.1 | Precoz |

† Tardía = su floración se presenta de 75 – 85 días después de la siembra.

††Precoz = su floración se presenta de 35 – 55 días después de la siembra.

Dimensiones: A= ancho, L= largo

En invernadero, la siembra de las variedades se llevó a cabo en la comunidad de San Agustín Calvario de San Pedro Cholula, Puebla, dos meses después, el 20 de abril del 2018. Localizado cerca de donde se realizó la siembra en campo en las coordenadas 19° 03' 00'' latitud norte y 98° 20' 04'' longitud oeste. Se sembraron cinco semillas en bolsas de plástico de 35 x 35 cm con 7 kg de una mezcla de tierra (50 % composta y 50 % suelo de cultivo), a una profundidad de 2 cm. De cada variedad de haba se tuvieron 3 repeticiones y cada repetición consto de 10 bolsas de plástico.

Un día antes de la siembra se humedeció el suelo con agua potable. Cuando las semillas comenzaron a emerger (aproximadamente 7 - 9 días después de la siembra, dependiendo de la variedad), la tierra se regó sin exceso para evitar enfermedades, y de esta forma las plantas se mantuvieron húmedas durante su desarrollo (Figura 2.1 b y b').



Figura 2.1 Condiciones de siembra de las variedades de haba mexicanas: a) parcelas para siembra en campo, a') plantas en campo, b) siembra en invernadero y b') plantas en invernadero.

Identificación, recolección y procesamiento del material vegetal

Tanto en campo como en invernadero cuando las plántulas comenzaron a emerger se identificaron con estambres de colores, de esta manera se estableció y monitoreo el día de su emergencia. Posteriormente las plantas se cortaron a los 10, 15 y 20 DDE (± 1 día). Adicionalmente sólo de la condición de campo, en la etapa de floración, se recolectaron las flores abiertas aproximadamente a los 57 -70 DDE de la planta (dependiendo de la variedad). Esta se realizó recolectando las flores por variedad de haba y posteriormente al azar se dividieron las flores en tres grupos para formar

las repeticiones. De esta manera solo en las flores se evaluó bajo un diseño experimental completamente al azar.

El procesamiento del material vegetal consistió en conservarlo por secado mediante liofilización, que es un método de conservación que seca al alimento mediante el fenómeno de la sublimación. El material vegetal fue sometido a congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h como mínimo antes de ser introducido a la liofilizadora (Labconco, 7400040), la cual cuenta con un Sistema de Liofilización FreeZone® Triad. Dentro de la cámara, el colector mantuvo una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, la presión que se estableció para el material vegetal fue de 0.120 - 0.220 mbar con un tiempo de secado de 7 - 16 h, condiciones que dependieron de la edad de la planta y de la estructura vegetal (por su tamaño). Las muestras ya liofilizadas fueron evaluadas en porcentaje de humedad (% H) con una termobalanza (OHAUS, MB 45) en donde tuvieron valores entre 7-10 %. El material liofilizado se pulverizó con un molino de granos (KRUPS, GX4100). Se tamizó a $500\text{ }\mu\text{m}$ con un tamiz de malla número 35 (MONTINOX), y se almaceno en frascos (ámbar) a temperatura ambiente. La Figura 2.2 muestra algunas de las imágenes del procesamiento llevado a cabo con el material vegetal.

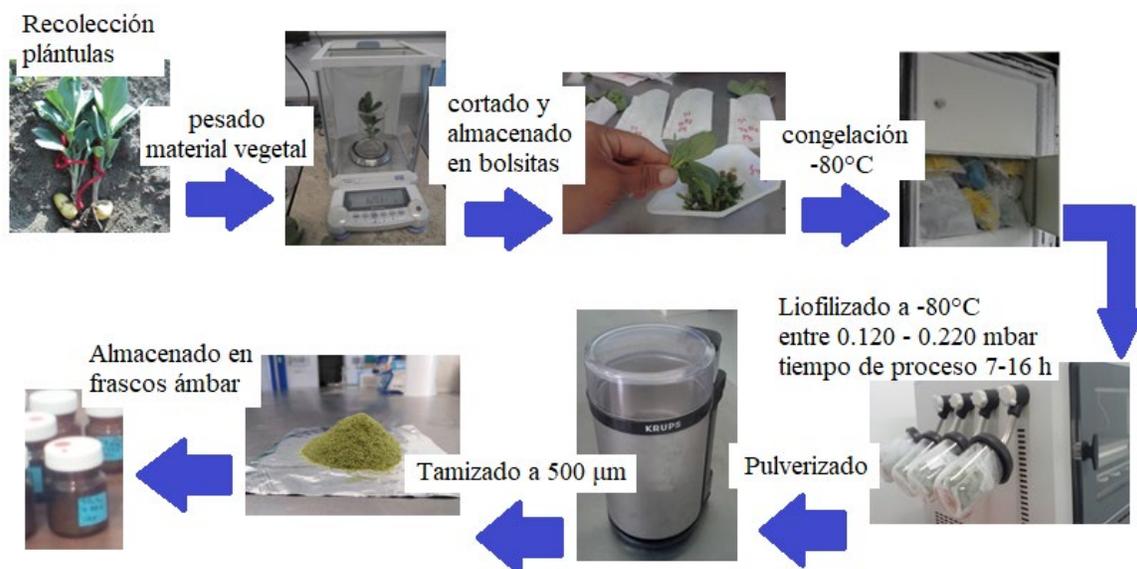


Figura 2.2 Diagrama del procesamiento realizado con el material vegetal para sus posteriores determinaciones.

Calidad de suelo en los experimentos

El análisis de suelo de los experimentos de campo e invernadero para las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, se realizó de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Descripción de suelo en campo. El experimento se realizó en un suelo neutro ($\text{pH} = 7.1$) de textura arena migajosa, el cual tuvo 0.75 % de materia orgánica, alto contenido de fósforo (P, 62 mg kg^{-1}) y muy alto en hierro (Fe, 60 mg kg^{-1}), con contenidos adecuados de cobre (Cu, 1.28 mg kg^{-1}), zinc (Zn, 2.30 mg kg^{-1}) y manganeso (Mn, 1.18 mg kg^{-1}), contenido medio de magnesio (Mg, $1.75 \text{ cmol kg}^{-1}$) y bajo en potasio (K, $0.28 \text{ cmol kg}^{-1}$) y calcio (Ca, $3.75 \text{ cmol kg}^{-1}$) (Cuadro 2.1A, Anexo).

Descripción de suelo en invernadero. El experimento se realizó en un suelo fuertemente alcalino ($\text{pH} = 8.58$) de textura franco arcillosa y con 1.90% de materia orgánica, alto en nitrógeno (N, 0.37%), fósforo (P, 103 mg kg^{-1}), potasio (K, 50 cmol kg^{-1}), hierro (Fe, 22.30 mg kg^{-1}), magnesio (Mg, 16 cmol kg^{-1}) y calcio (Ca, 82 cmol kg^{-1}), y muy alto en zinc (Zn, 8.12 mg kg^{-1}), con concentraciones adecuadas de cobre (Cu, 1.99 mg kg^{-1}) y manganeso (Mn, 5.51 mg kg^{-1}) (Cuadro 2.1A, Anexo).

Variables agroambientales

En los dos experimentos de campo e invernadero se colocaron registradores datalogger (HOBO, H08-004-02), para medir la temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa durante todo el período del experimento. Cada hora se realizaron los registros de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) e intensidad luminosa (lum sqf^{-1}), la cual posteriormente se convirtió en densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las variables agroambientales obtenidas durante el cultivo en campo de las plantas se aprecian en la Figura 2.3. Las variables agroambientales en campo e invernadero se promediaron en tres intervalos de tiempo en el día de 6:00 a 10:00 am, de 11:00 am a 14:00 pm y de 15:00 a 18:00 pm, para conocer el comportamiento de las variables durante esos intervalos de tiempo en el día. En el Cuadro 2.3 se presentan las medias generales de las variables agroambientales en los tres intervalos de tiempo en el día a los 10, 15 y 20 DDE de la planta de *V. faba*.

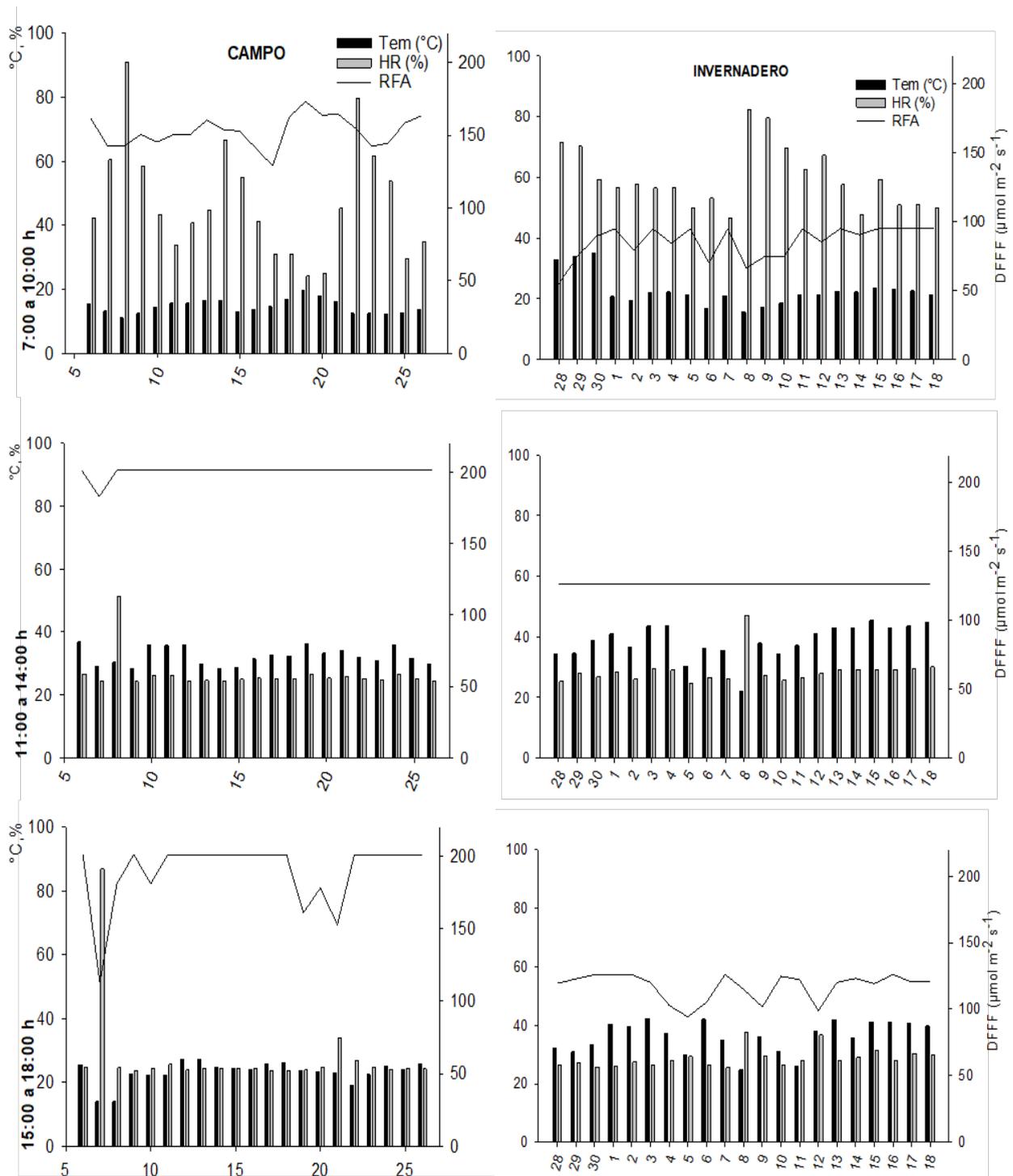


Figura 2.3 Medias de las variables agroambientales en tres intervalos de tiempo en el día (7:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm) en la condición de campo (izquierda) e invernadero (derecha), durante el crecimiento de las plantas de *Vicia faba* L. Temperatura (Tem), humedad relativa (HR) y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF).

Cuadro 2.3 Medias generales de las variables agroambientales en tres intervalos de tiempo en el día (6:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm), durante el crecimiento de las plantas de *Vicia faba* L. a los 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE).

| | Campo | | | | Invernadero | | | | |
|--|---------------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|---------------|
| | Hora día | DDE | | | TOTAL | DDE | | | Total |
| | | 10 | 15 | 20 | | 10 | 15 | 20 | |
| Tem (°C) | 07:00 a 10:00 | 14.37 | 15.22 | 14.63 | 14.74 | 23.72 | 22.60 | 22.58 | 22.97 |
| | 11:00 a 14:00 | 31.85 | 32.46 | 32.34 | 32.22 | 36.05 | 36.87 | 38.54 | 37.16 |
| | 15:00 a 18:00 | 28.39 | 28.48 | 28.92 | 28.60 | 35.18 | 35.00 | 36.11 | 35.43 |
| HR (%) | 07:00 a 10:00 | 52.53 | 26.95 | 47.35 | 42.28 | 60.04 | 62.32 | 59.81 | 60.72 |
| | 11:00 a 14:00 | 27.56 | 48.27 | 26.54 | 34.12 | 28.85 | 28.36 | 28.62 | 28.61 |
| | 15:00 a 18:00 | 29.66 | 27.98 | 27.21 | 28.28 | 27.75 | 28.35 | 28.68 | 28.26 |
| DFFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 07:00 a 10:00 | 145.99 | 148.57 | 148.57 | 147.71 | 79.43 | 80.38 | 82.98 | 80.93 |
| | 11:00 a 14:00 | 193.97 | 194.47 | 194.74 | 194.39 | 122.79 | 122.78 | 122.78 | 122.78 |
| | 15:00 a 18:00 | 184.22 | 180.99 | 184.47 | 183.23 | 113.59 | 112.63 | 114.08 | 113.44 |

Tem: Temperatura, HR: Humedad relativa, DFFF: Densidad de flujo de fotones fotosintéticos, DDE: día después de la emergencia.

Extracción de compuestos fenólicos

La extracción se realizó con base en las pruebas previamente realizadas en el Capítulo I. Para la extracción se pesaron 10 mg de polvo de planta de haba y se diluyeron con 10 mL de 100% metanol (J.T. Baker, 9070-03). La mezcla se homogenizó y se llevó a un baño ultrasónico durante 30 min (Auto Sd Science, AS5150B). Posteriormente se centrifugó a 4,600 *g* (7000 rpm, rotor de 8.39 cm de radio) a 4°C (2 min) (HERMLE, Z326K), se extrajo el sobrenadante y el extracto se depositó en eppendorf para ser almacenados a -20 °C previo a su análisis.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

La determinación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales se realizó de acuerdo a las pruebas previamente realizadas en el Capítulo 1.

Compuestos fenólicos totales. La metodología empleada se basó en Herald *et al.* (2012) con modificaciones. Para el análisis se ocupó el equipo lector multimodo espectral de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan flash) y una microplaca (Costar de 96 pozos de fondo plano de

polipropileno). Se utilizaron 25 μL de muestra o estándar, se agregaron 75 μL de agua desionizada y 25 μL de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 con agua desionizada), se mezcló la solución y reposo 6 min en oscuridad a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 100 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% (p/v) disuelto en agua y nuevamente se la solución mezcló. Posteriormente se dejó reposar durante 60 min en oscuridad a TA y se leyó a una longitud de onda de 725 nm. Se utilizó como blanco una mezcla de los reactivos y disolventes usados en el análisis, pero sin el analito, en lugar de este se utilizó agua (25 μL). Para la curva se utilizó el estándar ácido gálico (Sigma, G7384) diluido en agua. La concentración de la curva de calibración fue de 0 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores que generaron la siguiente ecuación de la recta $y = 0.0065x + 0.0965$ ($R^2 = 0.9985$). El estándar fue analizado por triplicado y la muestra con ocho repeticiones. Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG g^{-1} MS).

Flavonoides totales. El contenido de FT fue determinado de acuerdo a Herald *et al.* (2012) con mínimas modificaciones. Para el análisis se utilizó el equipo lector multimodo espectral de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan flash) y una microplaca (Costar de 96 pozos de fondo plano de polipropileno). A 25 μL de muestra o estándar, se le agregaron 100 μL de agua desionizada y 10 μL de nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%, se mezcló la solución y se dejó reposar por 5 min a TA. Posteriormente se añadieron 15 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3 , disuelto en metanol) al 10% (p/v), se mezcló la solución y se dejó reposar por 6 min a TA. Pasado el tiempo se le adicionaron 50 μL de hidróxido de sodio a 1 M (NaOH) y 50 μL de agua desionizada, se mezcla la solución y se deja reposar por 30 min en oscuridad a TA. Nuevamente la solución fue mezclada y se prosiguió a la lectura a una longitud de onda de 400 nm. Todas las muestras y el estándar fueron medidos contra el blanco (mezcla de los reactivos y disolventes usados en el análisis, pero sin el analito, en lugar de este se utilizó agua). Quercetina (SIGMA,) diluida en etanol absoluto (J.T. Baker, 9000-03) fue usado como estándar a diferentes concentraciones de 0 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la obtención de la ecuación de la recta $y = 0.0018x + 0.095$ ($R^2 = 0.9992$). El estándar fue analizado por triplicado y las muestras por octuplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalente de quercetina por gramo de materia seca (mg EQ g^{-1} MS).

Extracción de L-Dopa

La extracción de L-DOPA se realizó con el procedimiento empleado por García (2011), con algunas modificaciones. Se pesaron 35 mg de polvo de planta de haba y se agregaron 7.5 mL de

una solución de agua, acetonitrilo (ACN) (85:15). La mezcla se homogenizó con un instrumento de dispersión Ultra-Turrax (IKA, T25 basic S1) a 9,500 rpm durante 5 min. Posteriormente se centrifugo a 4,600 g (7,000 rpm) por 5 min, 2 mL del sobrenadante se almacenaron durante 24 h a 4°C. Previo al análisis 1 mL del sobrenadante se filtró en un acrodisco de 0.45 μm (Celltreat, 229744) y se depositó en un vial ámbar. En la Figura 2.4 se muestran el proceso de extracción de L-DOPA.

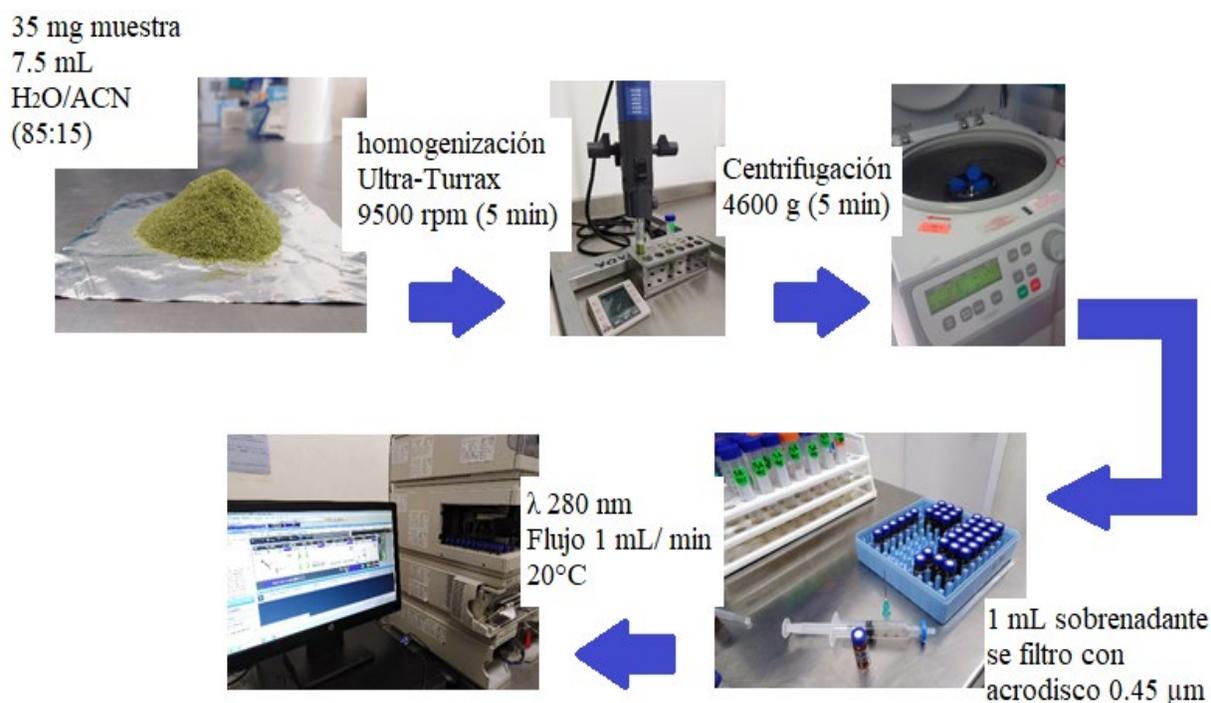


Figura 2.4 Proceso de extracción de L-DOPA de tejidos de haba (*Vicia faba* L.).

Condiciones de corrida del equipo HPLC para análisis de L-DOPA

Las condiciones que se implementaron para el análisis de L-DOPA fueron de acuerdo a Etemadi *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se utilizó un equipo HPLC (Hewlett packard, 1100) con un detector de arreglo de diodos y una columna LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) (Agilent Technologies, 250-4). La fase móvil consistió de 0.1 % (v/v) de ácido acético glacial (98 %) y metanol (2 %). La temperatura de la columna fue de 20°C, se inyectaron 5 μL de muestra, el flujo fue isocrático de 1 mL min⁻¹ y la detección fue a 280 nm. La curva de calibración se realizó con el

estándar de L-DOPA (Sigma, No. Cat. PHR1271), que se disolvió en la fase móvil para realizar una curva de calibración de 4 – 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El tiempo de retención del estándar fue al minuto 6.24. El análisis de regresión lineal mostro un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9993 (Figura 2.5).

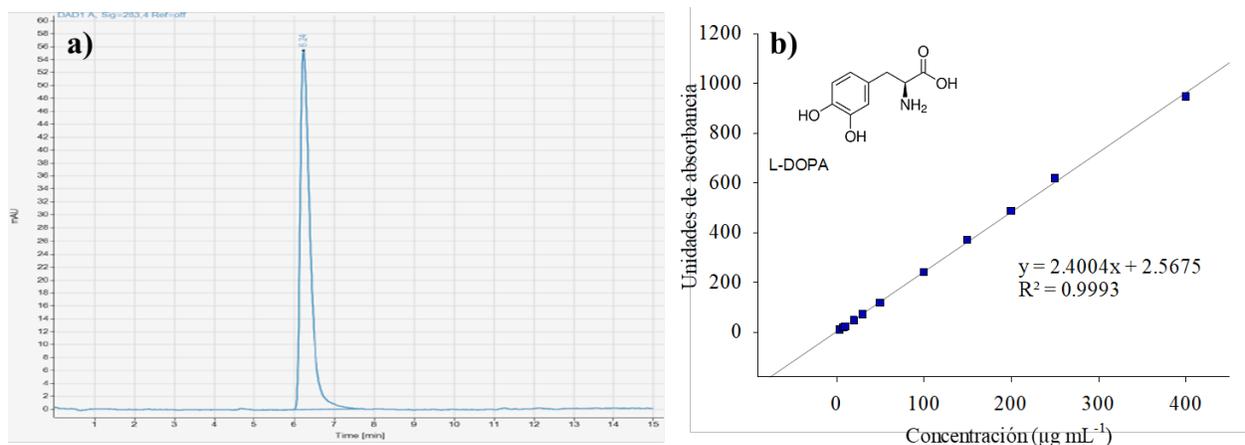


Figura 2.5 Cromatograma (a) y curva de calibración (b) del estándar de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Extracción de isoflavonas

La extracción se realizó de acuerdo a Wang y Murphy (1994), con algunas modificaciones para una mejor extracción. Se pesaron 100 mg de la muestra y se colocaron en un frasco ámbar, se agregó una solución de 5 mL de acetonitrilo (ACN) (J. T. Baker, 9017) más 1 mL de HCl etanólico a 0.5 N con 3 mg de 2,6-Di-ter-butil-4-metilfenol (BHT) (Sigma, B1378). El frasco se tapó y se homogenizó durante 2 h a temperatura ambiente. Después se filtró al vacío con papel filtro (Whatman No. 2, 1002 - 055) en un matraz kitasato. Posteriormente el filtrado se concentró a sequedad en un rotavapor (Heidolph, 4000) a 37 °C y se resuspendió con 2 mL de 80 % metanol grado HPLC (J. T. Baker, 9093) y se almacenó por 24 h en refrigerador a 4°C antes de su análisis. Previo a su análisis el extracto se diluyó 1:5 con la fase móvil y se filtró en un acrodisco de membrana de PVDF de 0.45 μm (CELLTREAT, 229744) y se depositó en un vial ámbar. En la Figura 2.6 se muestran el proceso de extracción de las isoflavonas.



Figura 2.6 Proceso de extracción de las isoflavonas.

Condiciones de corrida del equipo HPLC para análisis de isoflavonas

Las condiciones utilizadas para el análisis de isoflavonas fueron de acuerdo a César *et al.* (2006). Se utilizó el equipo HPLC (Perkin Elmer, 200a) que cuenta con detector de arreglo de diodos. Se usó una columna SuperC₁₈ (5 μm tamaño de partícula) (ACE Ultra Core, ACE-121-2546). Como fase móvil se utilizó 0.1% de ácido acético glacial y metanol (52:48) (v/v). La temperatura de la columna fue de 30°C, se inyectaron 10 μL de muestra, el flujo fue isocrático (1 mL min⁻¹) y la detección fue a 254 nm. La curva de calibración se realizó con el estándar daidzeína (Sigma-Aldrich, 16587), que se disolvió con 80 % metanol para realizar una curva de calibración de 0.04 – 9.6 μg mL⁻¹. El tiempo de retención del estándar fue al minuto 10.7. El análisis de regresión lineal mostro un coeficiente de determinación (R²) de 0.9985 (Figura 2.7).

Cantidad de compuestos bioactivos en plantas y flores de *Vicia faba* L.

Para la obtención de la cantidad de los compuestos bioactivos (CFT, FT, L-DOPA y daidzeína) en las plantas de 10, 15 y 20 DDE y en las flores obtenidas de los experimentos en campo e invernadero, la concentración de cada compuesto bioactivo se expresó con base en la biomasa en materia seca (MS) por planta a los diferentes DDE, y con base en la biomasa en MS de 30 flores.

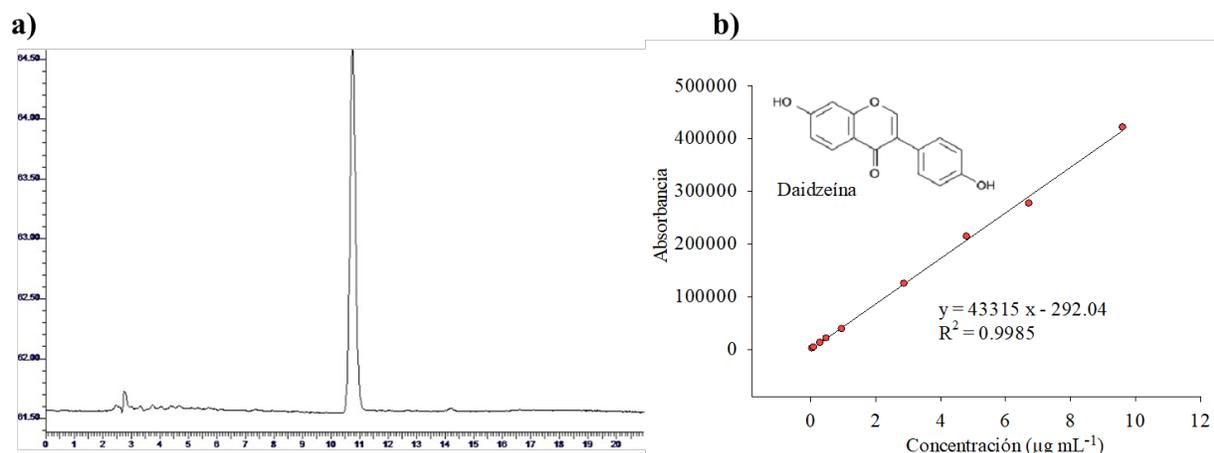


Figura 2.7 Cromatograma (a) y curva de calibración del estándar de daidzeína (b).

Análisis estadísticos

Con los resultados de los compuestos bioactivos obtenidos de las plantas y de las flores, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Además con los resultados de las plantas se determinó la asociación entre compuestos bioactivos (CFT, FT, L-DOPA, DAD) y variables agroambientales [temperatura (Tem), humedad relativa (HR) y la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF)] y de suelo [conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), fósforo (P), nitrógeno (N), textura] con el análisis multivariable de correlaciones canónicas, con el procedimiento PROC CANCORR del paquete estadístico SAS versión 9 y con el programa SigmaPlot versión 14 se realizó el gráfico de los coeficientes de correlación estructural.

2.3 Resultados y discusión

Análisis de varianza y comparación de medias de Tukey de resultados de compuestos bioactivos obtenidos en plantas de *Vicia faba* L.

El Cuadro 2.4 muestra los resultados del análisis de varianza de CB en plantas de haba sembradas en condiciones de campo e invernadero. En donde se aprecia que todos los CB (CFT, FT, L-DOPA y DAID) tuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). Los coeficientes de variación (CV) de los CB fueron bajos, excepto el de los FT que fue de 19%. Todas las fuentes de variación;

variedad (VAR), precocidad (PREC), condición de crecimiento (CONC), día después de la emergencia (DDE) y BLOQUE, mostraron tener diferencias significativas (ya sea, $p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$) en todos los CB evaluados. Salvo algunas excepciones como, en CFT con la fuente de variación PREC, en FT con la fuente de variación BLOQUE y en L-DOPA con PREC y BLOQUE. En el caso de las interacciones se puede observar que sólo en VAR*DDE y VAR*CONC*DDE en L-DOPA no se encontraron diferencias significativas. Los resultados del coeficiente de determinación (R^2) de cada CB fueron altos (0.69 - 0.99) por lo que el modelo empleado fue adecuado para los análisis (Cuadro 2.4).

En la comparación de medias de Tukey por VAR en todos los CB hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a excepción de L-DOPA en donde las variedades ICAMEX-V31-P, Rojita-T, Matlatzintla-P y José María-T no presentaron diferencias, 73.47, 72.92, 69.12 y 68.72 mg g⁻¹ MS, respectivamente. Con relación a la PREC, las variedades tardías (T) estadísticamente fueron superiores en contenidos de CFT, FT y L-DOPA respecto a las precoces (P). Mientras que las variedades P fueron superiores en contenidos de daidzeína a diferencia de las T. Por CONC, campo (CAM) fue estadísticamente superior en contenidos de todos los CB respecto a los de invernadero. En DDE se aprecia que a los 10 DDE, los contenidos de CFT (125.52 mg g⁻¹ MS), FT (99.65 mg g⁻¹ MS) y L-DOPA (82.58 mg g⁻¹ MS) fueron superiores y estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) a los demás. Mientras que a los 20 DDE la planta de haba, el contenido de DAID (0.330 mg g⁻¹ MS) fue superior en contenidos y estadísticamente diferentes a las demás edades. Con respecto a BLOQUE solo en CFT y DAID se presentaron diferencias entre los bloques (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.4 Análisis de varianza de contenidos de compuestos bioactivos en plantas de haba de 10, 15 y 20 DDE sembradas en condiciones de campo e invernadero.

| Variable | Media | CV (%) | CUADRADOS MEDIOS | | | | | | | |
|----------|----------|--------|------------------|----------------------|------------|------------|----------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| | | | VAR | PREC | CONC | DDE | Bloque | VAR*CONC | VAR*DDE | VAR*CONC*DDE |
| CFT | 107.64** | 13.73 | 7974.31** | 256.22 ^{NS} | 1373.68* | 19256.13** | 1350.73** | 2824.34** | 2126.84** | 559.28** |
| FT | 89.87** | 19 | 22399.60** | 1517.08* | 17918.86** | 8106.62** | 207.71 ^{NS} | 4494.12** | 1538.47** | 7386.30** |
| L-DOPA | 71.05** | 7.65 | 111.15* | 4.02 ^{NS} | 1100.85** | 3140.45** | 29.97 ^{NS} | 247.59** | 41.77 ^{NS} | 48.70 ^{NS} |
| DAID | 0.30** | 3.04 | 0.09** | 0.18** | 3.35** | 0.01** | 0.01** | 0.07** | 0.76** | 0.00** |

C FT; Compuestos fenólicos totales (mg EAG g⁻¹ MS), FT; Flavonoides totales (mg EQ g⁻¹ MS); L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina (mg g⁻¹ MS), DAID; Daidzeína (mg g⁻¹ MS), CV; Coeficiente de variación, VAR; Variedad, PREC; Precocidad, CONC; Condición de crecimiento, DDE; Día después de la emergencia. NS; No significancia, * $p \leq 0.05$; Diferencias significativas, ** $p \leq 0.01$; Diferencias altamente significativas.

Cuadro 2.5 Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) de contenidos de compuestos bioactivos en plantas de *Vicia faba* L.

| | | CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | DAID (mg g ⁻¹ MS) |
|---------------|---------------|---|---|--|--|
| VAR | Rojita | 121.12a | 117.184a | 72.927a | 0.216d |
| | ICAMEX-V31 | 114.672a | 87.018b | 73.471a | 0.315b |
| | José María | 96.355b | 67.863b | 68.721a | 0.288c |
| | Matlantzintla | 98.447b | 87.428b | 69.122a | 0.394a |
| PREC | P | 108.738a | 87.223b | 71.29a | 0.354a |
| | T | 106.560a | 92.523a | 70.824a | 0.252b |
| CONC | CAM | 110.171a | 98.981a | 74.970a | 0.519a |
| | INV | 105.127b | 80.765b | 67.150b | 0.087b |
| DDE | 10 | 125.528a | 99.658a | 82.583a | 0.278c |
| | 15 | 103.971b | 91.367b | 70.890b | 0.301b |
| | 20 | 93.447c | 78.595c | 59.707c | 0.330a |
| BLOQUE | 1 | 111.214a | 91.498a | 71.228a | 0.299b |
| | 2 | 108.903a | 90.012a | 69.868a | 0.328a |
| | 3 | 102.829b | 88.109a | 72.084a | 0.281c |

VAR; Variedad, PREC; Precocidad, CONC; Condición de crecimiento, DDE; Día después de la emergencia, CAM; Campo, INV; Invernadero, P; Precoz, T; tardía, CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales; L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína. Medias con la misma letra por columna, no son significativamente diferentes.

Influencia de la condición de crecimiento en plantas de variedades de *Vicia faba* L. por compuesto bioactivo

Compuestos fenólicos totales (CFT)

En CFT por CONC se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), siendo la condición de campo la que presentó en promedio los contenidos más altos (110.17 mg EAG g⁻¹ MS) en comparación con los de invernadero (105.127 mg EAG g⁻¹ MS) (Cuadro 2.5). En cada condición de crecimiento campo e invernadero hubo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). En campo las variedades Rojita-T e ICAMEX-V31-P, tuvieron los contenidos más altos (123.98 y 124.16 mg EAG g⁻¹ MS, respectivamente) y fueron estadísticamente diferentes a las demás (Figura 2.8). En invernadero, en todas las variedades de haba se observó una reducción del contenido de CFT, siendo la variedad Rojita-T la que presentó los contenidos más altos (118.26 mg EAG g⁻¹ MS) y fue estadísticamente diferente a las demás.

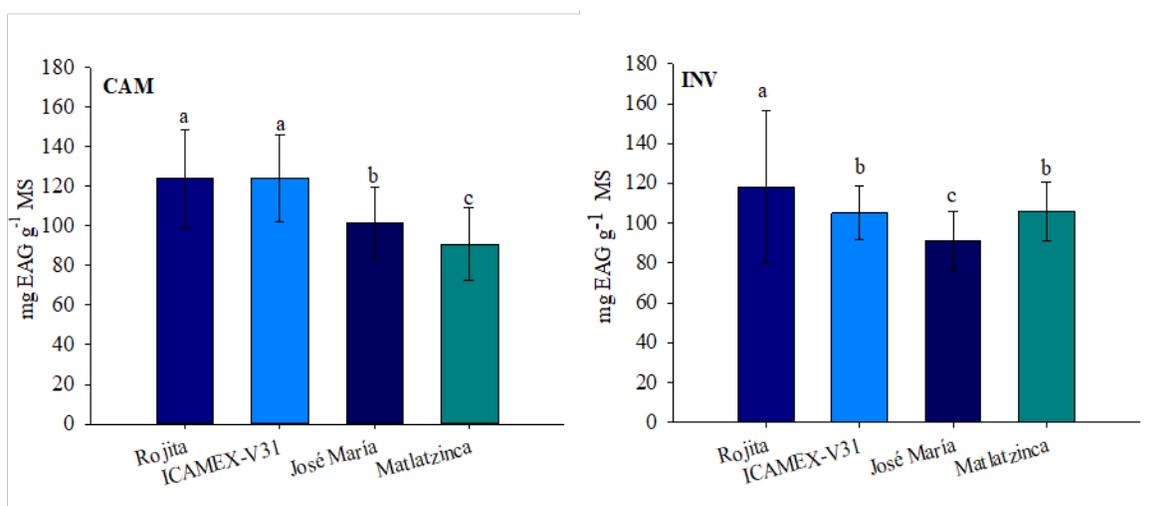


Figura 2.8 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). Medias con letras distintas por variedad son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 27$).

L-3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA)

La evaluación de los CFT cuantifica los polifenoles totales presentes en la muestra. En la planta de haba se sabe que L-DOPA está presente entre los compuestos fenólicos encontrados,

fitoquímico que es considerado la piedra angular (Patil *et al.*, 2013) o el estándar de oro (Nagatsu y Sawada *et al.*, 2009) en el tratamiento de Parkinson.

Por variedad y CONC en campo e invernadero se aprecia en la Figura 2.9, la media del contenido de CFT y la media del contenido de L-DOPA encontrado en las plantas. Como se observa, independientemente de la condición de crecimiento, L-DOPA representa más del 60% del contenido de CFT encontrado en las plantas de haba, esto depende de la variedad. Así que por su alto contenido de L-DOPA, *V. faba* es considerada una de las principales fuentes biológicas para su producción (Patil *et al.*, 2013).

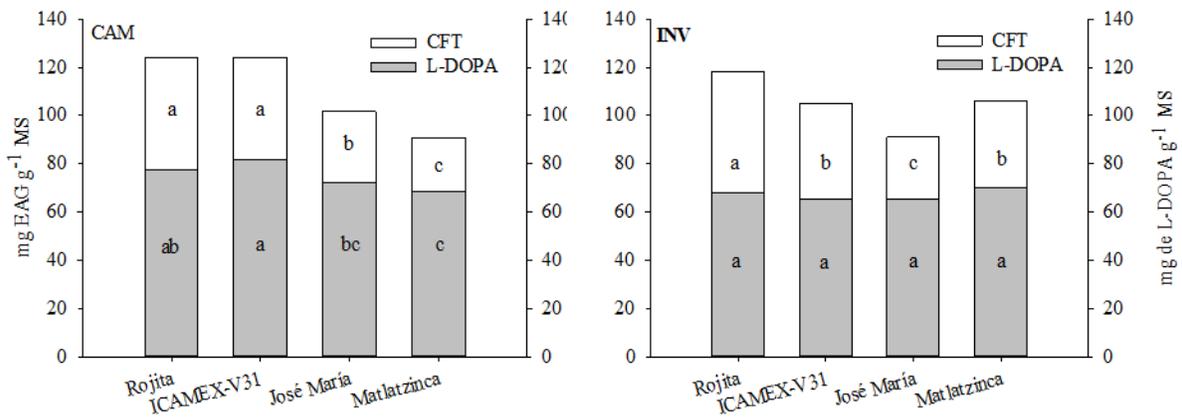


Figura 2.9 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, $n = 27$) y contenido de L-DOPA ($n = 3$) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). Medias con letras distintas por variedad son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuando se estima el contenido de L-DOPA en plantas de haba por DDE se observa que a los 10 DDE los contenidos son superiores en todas las variedades y suele haber una tendencia descendente cuando las plantas van madurando (Figura 2.10). Esta misma tendencia descendente también sucede con los CFT (Anexo 2A, Figura 2.1A). Respecto a L-DOPA en CONC se observaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en donde campo presentó el contenido más alto con una media de $74.97 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ (Cuadro 2.5). En campo se observó que las variedades de haba ICAMEX-V31-P, José María-T y Matlatzintla-P, tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) por DDE, a diferencia de la variedad Rojita-T que no mostró diferencias (Figura 2.10). En

el caso de la CONC en invernadero todas las variedades mostraron diferencias significativas (ya sea $p \leq 0.01$ o $p \leq 0.05$).

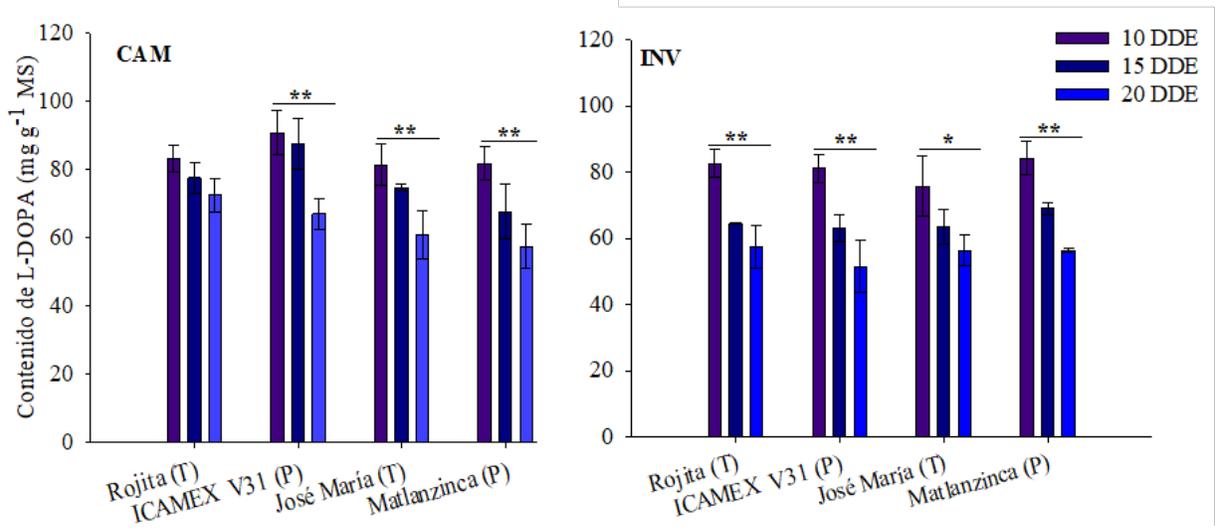


Figura 2.10 Contenido de L 3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). Diferencias entre días después de la emergencia, * $p \leq 0.05$; diferencias significativas, ** $p \leq 0.01$; diferencias altamente significativas. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 3$).

Los contenidos altos de L-DOPA en los estados tempranos del desarrollo de la planta se atribuyen a que la plántula debe protegerse de factores que interfieran para alcanzar su desarrollo. Dado que este fitoquímico tiene un efecto alelopático y actúa en defensa contra insectos herbívoros, de esta manera L-DOPA sirve de protección en el desarrollo temprano de la planta. Al respecto en un estudio se evaluó la función alelopática del extracto de raíces y hojas de *Mucuna pruriens* en plantas de lechuga. Se encontró que hubo una reducción en el crecimiento de las plantas, donde su afectación principal fue en el crecimiento radicular con un 50 % menor al del control. En el extracto se identificó a L-DOPA como mayor inhibidor, con una concentración de 0.5 – 1.5 % en peso fresco (Fujii *et al.*, 1991). Al igual en el estudio de Sharma (2015) se evidenció el efecto fitotóxico que tiene L-DOPA en el crecimiento de plantas de arroz (*Oriza sativa*), ya que tuvo un efecto inhibitorio en la longitud de la raíz y el brote de las plantas desde que L-DOPA fue agregada al experimento. Siendo mayor su efecto alelopático con el aumento de la concentración del metabolito, con 1000 μM de L-DOPA hubo una reducción importante de hasta 53 % en la longitud

de la raíz, en comparación con el control, mientras que en la longitud del brote la reducción fue del 31%. También se ha documentado que metabolitos como los aminoácidos no proteicos, como L-3,4- dihidroxifenilalanina, encontrados en las plantas sirven como mecanismo de defensa contra insectos herbívoros, ya que el nitrógeno se almacena en una forma que es metabólicamente inaccesible para los herbívoros, además de que interfiere con el metabolismo de los aminoácidos de los animales, entre otros efectos tóxicos en los insectos (Huang *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2015) en su estudio evalúa el efecto tóxico causado por diferentes compuestos fenólicos encontrados en las plantas (ácido gálico, ácido tánico y L-DOPA) en insectos como la mosca de la fruta (*Drosophila*), mariposa o gusano de seda (*Bombyx mori*) y el gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*). En donde L-DOPA tuvo un afectó en el crecimiento y desarrollo de las larvas de *Drosophila*, y también el desarrollo de *H. armigera* fue marcadamente afectado.

En este estudio, en todas las variedades se encontró que los contenidos mayores de L-DOPA se presentaron a los 10 DDE, no obstante, en otros estudios como el de Randhir y Shetty (2003) encontraron que, con la agregación de elicitores naturales en la semilla de haba como hidrolizados de proteínas de pescado (HPP), lactoferrina (LF) y extracto de orégano (EO), cuando fueron evaluadas las plántulas de haba de 12, 16 y 20 días de crecidas, el contenido de L-DOPA se incrementó. Principalmente a los 16 días con el elicitor HPP obtuvieron valores de 16.5 mg g⁻¹ de MF. También reportes recientes mostraron que los contenidos de L-DOPA en plantas de 15 días después de la germinación fueron de 13.3 mg g⁻¹ MF (Etemadi *et al.*, 2018). El valor obtenido en el estudio a los 10 DDE en promedio fue de 85.58 mg g⁻¹ MS (independientemente del tipo de variedad y condición de crecimiento), valor que fue superior a lo encontrado por estos investigadores, posiblemente porque sus resultados fueron evaluados en materia fresca, mientras que en el estudio se trabajó con los valores en materia seca.

Al evaluar la biomasa de la planta a los 10, 15 y 20 DDE y la cantidad de L-DOPA por variedad de haba y CONC, se observa que a los 20 DDE se presenta la cantidad mayor de biomasa en la planta y a su vez se incrementa la cantidad de L-DOPA (Figura 2.11). Por ejemplo, en la variedad José María (T) de los 10 a los 20 DDE se presenta un incremento en su biomasa de 0.89 a 1.86 g MS y también se obtiene un incrementó de la cantidad de 73.21 a 113.19 mg de L-DOPA planta⁻¹. En este estudio, así como en el de Etemadi *et al.* (2018), se encontró que el contenido mayor de L-DOPA se presentó en plantas jóvenes de haba, pero para extraer el contenido más alto se tiene que considerar la cantidad de tejido acumulado, ya que está en función tanto del contenido como

de la biomasa. Así que por la acumulación de biomasa en la planta se encontró una mayor cantidad en plantas de 20 DDE a diferencia de las de 10 DDE.

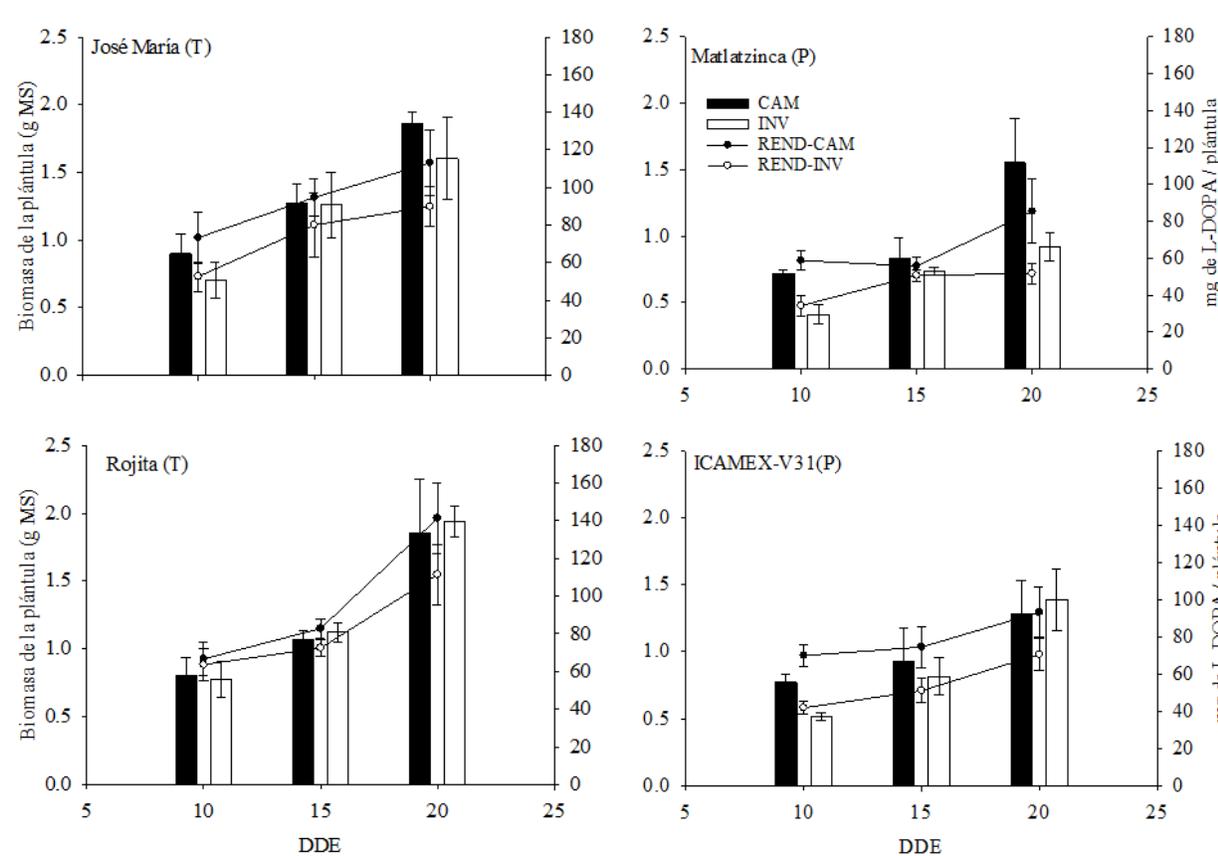


Figura 2.11 Biomasa de plantas de *Vicia faba* L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y cantidad de L3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA) por planta, de cuatro variedades de *V. faba* bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). Biomasa ($n = 28$) (CAM ■, INV □), cantidad ($n = 3$) (CAM ●, INV ○). Las barras indican \pm desviación estándar.

Flavonoides totales (FT)

En FT por CONC se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$), siendo la condición de campo la que presentó los contenidos más altos (98.98 mg EQ g^{-1} MS) en comparación con los de invernadero (Cuadro 2.5). En cada condición de crecimiento campo e invernadero se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). En campo e invernadero la variedad Rojita-T tuvo los contenidos más altos (137.50 y 96.86 mg EQ g^{-1} MS, respectivamente) y fue estadísticamente

diferente a las demás (Figura 2.12). La condición de invernadero presenta una reducción en contenidos de FT respecto a la condición de campo, esta disminución al parecer depende de la variedad ya que los contenidos se redujeron 29.56, 10.31 y 30.23% en la variedad Rojita-T, ICAMEX-V31-P y José María-T, respectivamente. Mientras que la variedad Matlatzintla-P tuvo un aumento de 1.59% de FT respecto al contenido en campo (Figura 2.12).

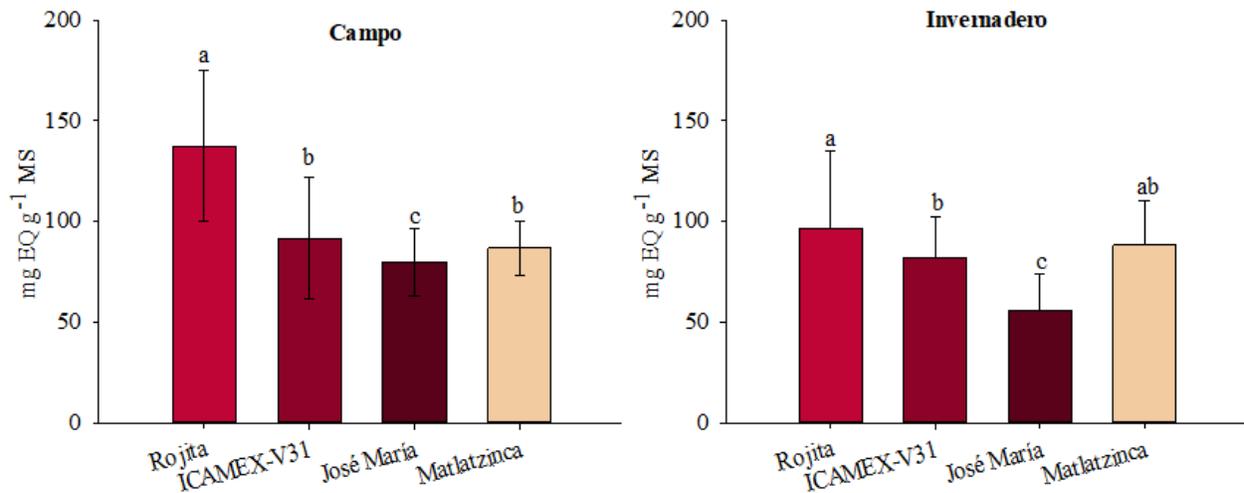


Figura 2.12 Contenido de flavonoides totales en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento. Medias con letras distintas por variedad son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 27$).

La intensidad luminosa pudo haber tenido un efecto en los flavonoides, puesto que en campo se presentó una radiación mayor que en invernadero, por ejemplo, de 11:00 a 14:00 h hubo una mayor DFFF $194.39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en campo, mientras que en invernadero la DFFF fue de $122.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro 2.3). Julkunen-Tiitto *et al.* (2015) documentan que los flavonoides se bioacumulan en respuesta al aumento de la radiación UV. También se documenta que depende de la temporada o la hora del día en que incide la radiación UV, dado que los compuestos de protección UV están relacionadas con la necesidad de una mayor protección alrededor del mediodía. Al igual se ha demostrado que con base en los niveles de radiación UV-B que incide en las plantas se pueden acumular cierto tipo de flavonas que absorben la radiación UV (Casati y Walbot, 2005).

Daidzeína

Dentro del grupo de los flavonoides se tienen a las isoflavonas, y en haba se encuentran isoflavonas como daidzeína (Kaufman *et al.*, 1997; Kirakosyan *et al.*, 2004). En la Figura 2.13 se muestra por CONC en campo e invernadero la media del contenido de FT, además de la media del contenido de daidzeína encontrado en las plantas, relación que evidencia la proporción que corresponde de daidzeína del total de flavonoides en las variedades de *V. faba*. El contenido de daidzeína encontrado en las plantas de haba depende tanto de la condición de crecimiento como de la variedad, se puede apreciar que en invernadero los contenidos de este metabolito fueron considerablemente menores. Por ejemplo, en la variedad Matlatzintla hubo una reducción aproximadamente de siete veces de la condición de campo a invernadero, de 0.690 a 0.098 mg de daidzeína g⁻¹ MS, respectivamente (Figura 2.13).

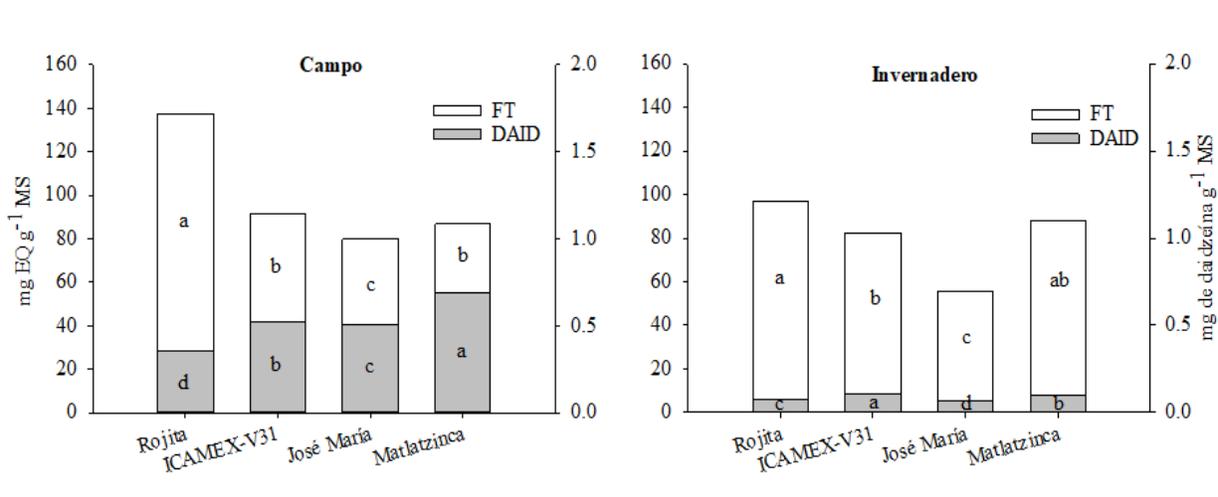


Figura 2.13 Contenido de flavonoides totales (FT, $n = 27$) y contenido de Daidzeína (DAID, $n = 3$) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento. Medias con letras distintas por variedad son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Daidzeína es considerado un fitoestrógeno por tener una estructura química similar al estrógeno β -estradiol (Křížová *et al.*, 2019). El cual es utilizado para reducir los síntomas climatéricos de la mujer, además de que se ha demostrado su efectividad en reducir el cáncer de mama y de próstata y en evitar enfermedades óseas (Anderson *et al.*, 1999; Křížová *et al.*, 2019).

El contenido de daidzeína por CONC presentó diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en donde campo tuvo un contenido superior (aproximadamente 6 veces más) con una media de $0.519 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ a lo encontrado en invernadero (Cuadro 2.5). En campo, cuando se evalúa por DDE, se observó una tendencia ascendente de los 10 a los 20 DDE en las variedades Rojita-T, ICAMEX-V31-P y José María-T. En contraste a lo obtenido con los FT que al evaluar las plantas en los diferentes días de emergencia presentaron una tendencia descendente (Anexo 2A, Figura 2.2A). Mientras que en la variedad Matlatzintla-P no presentó esta tendencia (Figura 2.14). Además de que sólo las variedades Rojita-T y José María-T tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). En invernadero el comportamiento de las variedades fue diferente, ya que no presentan alguna tendencia, además de que sólo la variedad Matlatzintla-P fue estadísticamente diferencias ($p \leq 0.05$) en DDE. En ambas CONC se aprecia que las variedades precoces (ICAMEX-V31-P y Matlatzintla-P) presentaron contenidos más altos que en las variedades tardías (Rojita-T y José María-T) (Figura 2.14).

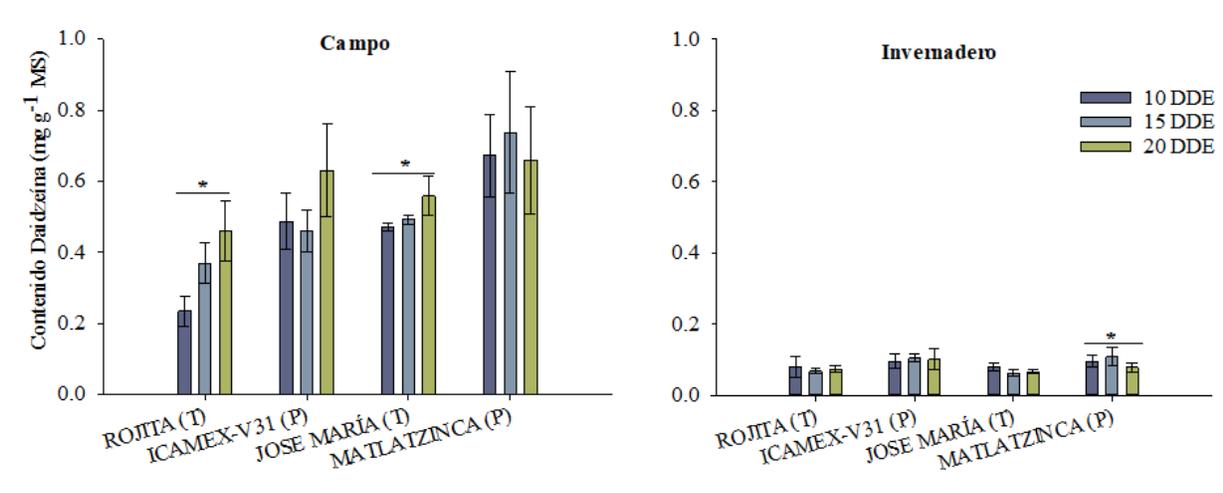


Figura 2.14 Contenido de daidzeína en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento. Diferencias entre días después de la emergencia (DDE), $*p \leq 0.05$; diferencias significativas. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 3$).

Al evaluar la biomasa de la planta a los 10, 15 y 20 DDE y la cantidad de daidzeína, por variedad y CONC, se detecta que a los 20 DDE se presentó mayor acumulación de biomasa en la planta y a su vez se incrementó la cantidad de daidzeína (Figura 2.15).

Entre las variedades de haba, la biomasa obtenida de las plantas varió entre campo e invernadero. Una tendencia similar se observó con la cantidad de daidzeína, ya que entre variedades y por CONC las cantidades variaron, siendo muy evidente la reducción de la cantidad de daidzeína en invernadero en comparación con campo. Como fue en el caso de la variedad Matlatzintla-P, cultivada en campo, en donde de los 10 a los 20 DDE la planta presenta un incremento en su biomasa de 0.77 a 1.34 g MS, respectivamente. Mientras que la biomasa de plantas de invernadero fue de 0.37 a 0.92 g MS, respectivamente. A su vez, la cantidad se incrementó en campo de 0.52 a 0.88 mg de daidzeína planta⁻¹ MS, respectivamente, y en invernadero su incremento fue casi nulo de 0.03 a 0.07 mg de daidzeína planta⁻¹ MS. Así que la cantidad de daidzeína en las plantas de haba crecidas en invernadero se redujo considerablemente (Figura 2.15).

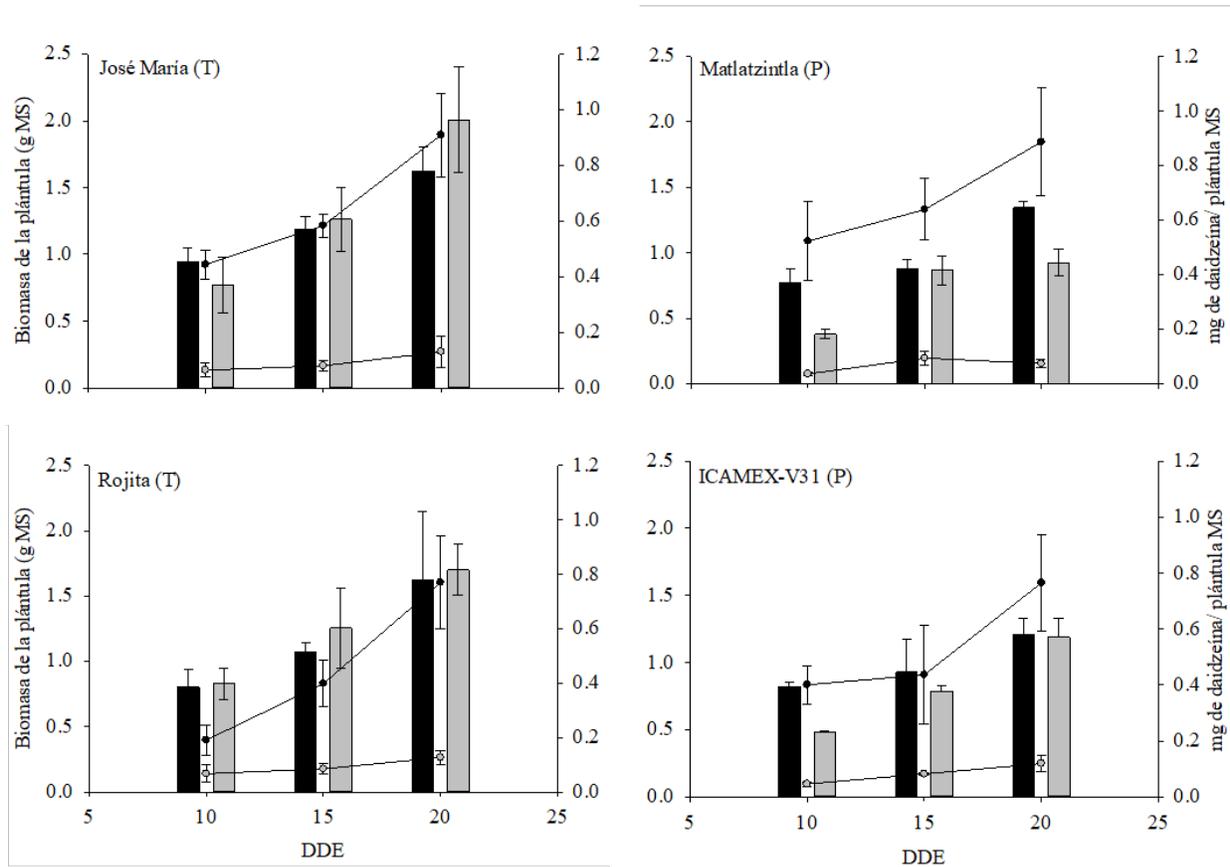


Figura 2.15 Biomasa de plantas de *Vicia faba* L. de 10, 15 y 20 días después de la emergencia (DDE) y cantidad de daidzeína por planta, de cuatro variedades de *V. faba* bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). Biomasa ($n = 28$) (CAM ■, INV □), cantidad ($n = 3$) (CAM ●, INV ○). Las barras indican \pm desviación estándar.

Análisis de varianza y comparación de medias de Tukey de resultados de compuestos bioactivos obtenidos en flores de variedades de *Vicia faba* L.

Los resultados del análisis de varianza de CB en flores de variedades de haba obtenidas en condiciones de campo, muestran que todos los CB (CFT, FT, L-DOPA y DAID) tuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). Los CV de todos los CB tuvieron valores bajos, menores de 8 %. Las fuentes de variación VAR y PREC mostraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en todos los CB evaluados en las flores de las variedades de haba, excepto FT que no mostro diferencias significativas en PREC. Los resultados del R^2 de los CB fueron altos por lo que el modelo es adecuado para explicar las variables (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6 Análisis de varianza del contenido de compuestos bioactivos en flores de haba sembradas en condiciones de campo.

| Variable | Media | C.V. (%) | Cuadrados medios | | |
|---|----------|----------|------------------|------------|----------------|
| | | | VAR | PREC | R ² |
| CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | 162.01** | 3.72 | 801.14** | 759.51** | 0.925 |
| FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | 165.74** | 4.67 | 755.20** | 54.12NS | 0.846 |
| L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | 92.13** | 7.89 | 285.78** | 274.79** | 0.749 |
| DAID (mg g ⁻¹ MS) | 0.458** | 7.77 | 19315.08** | 43527.68** | 0.919 |

CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales; L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína, CV.; Coeficiente de variación, VAR; Variedad, PREC; Precocidad, CONC; Condición de crecimiento, DDE; Día después de la emergencia. NS; No significancia, * $p \leq 0.05$; Diferencias significativas, ** $p \leq 0.01$; Diferencias altamente significativas.

La comparación de medias de Tukey por VAR mostró que todos los CB (CFT, FT, L-DOPA y DAID) tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2.7). En donde las flores de la variedad Rojita-T presentaron los contenidos más altos de CFT (177.7 mg EAG g⁻¹ MS), FT (183.12 mg EQ g⁻¹ MS) y L-DOPA (102.1 mg g⁻¹ MS) y fue estadísticamente diferente a las demás, excepto con FT (183.12 mg EQ g⁻¹ MS) que no presentó diferencia significativa con la variedad

ICAMEX-V31-P (175.27 mg EQ g⁻¹ MS). Mientras que DAID se presentó mayoritariamente con las flores de la variedad ICAMEX-V31-P (0.519 mg g⁻¹ MS) y fue estadísticamente diferente a las demás ($p \leq 0.05$). Los valores más bajos de CB entre las diferentes variedades de haba se presentaron en las flores de la variedad Matlatzintla-P en CFT (139.4 mg EAG g⁻¹ MS), FT (151.96 mg EQ g⁻¹ MS) y en L-DOPA (79 mg g⁻¹ MS), y en las flores de la variedad José María-T en DAID (0.349 mg g⁻¹ MS). En la Figura 2.16 A se presenta gráficamente la concentración de CB en flores de las diferentes variedades de haba.

Con relación a la PREC se observa que todos los CB mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a excepción de FT, donde las flores de las variedades tardías presentaron los contenidos más altos de CFT, FT y L-DOPA, y las flores de las variedades precoces mostraron los contenidos más altos de DAID (Cuadro 2.7).

Para evitar generalizar cantidades de compuestos en la planta de alguna especie, es importante especificar el órgano y la variación individual de metabolitos secundarios, ya que no en todos los tejidos se encuentran las mismas cantidades y a veces compuestos determinados están en órganos específicos (Hadacek, 2002). Es por ello que en este trabajo se quiso conocer las cantidades de CB presentes en diferentes etapas del desarrollo de la planta de haba. De esta manera con los resultados obtenidos se pudo demostrar que las plantas, independientemente del día de la emergencia (10, 15 y 20 DDE) y la variedad, tuvieron contenidos menores de todos los CB en comparación con las flores.

La variedad Rojita-T tuvo los contenidos más altos de L-DOPA (102.13 g kg⁻¹ MS) en las flores, dicho contenido fue superior al obtenido en flores liofilizadas de plantas de haba de diferentes tonalidades de color comunes y poco frecuentes (rosa con líneas moradas y puntos negros, blanco puro, marrón y carmesí) que tuvieron valores de entre 27.8 - 63.5 g kg⁻¹ MS (Hu *et al.*, 2015).

Las flores de la variedad Rojita-T tuvieron la cantidad más alta de todos los CB, con base en la MS de 30 flores: CFT (141.26 mg), FT (145.86 mg) y L-DOPA (81.35 mg), excepto para DAID que fue la variedad ICAMEX-V31-P, la que tuvo el contenido mayor (0.3853 mg) (Figura 2.16 B). La cantidad y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) de los demás CB se presentan en el Anexo 2A en el Cuadro 2.4A y el Cuadro 2.5A, respectivamente.

Cuadro 2.7 Comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) de contenidos de compuestos bioactivos en flores de *Vicia faba* L.

| | | CFT (mg EAG g⁻¹ MS) | FT (mg EQ g⁻¹ MS) | L-DOPA (mg g⁻¹ MS) | DAID (mg g⁻¹ MS) |
|-------------|--------------|---|---|--|--|
| VAR | Rojita | 177.7a | 183.12a | 102.1a | 0.447c |
| | ICAMEX-V31 | 168.7b | 175.27a | 96.0b | 0.519a |
| | José María | 162.2c | 152.61b | 92.0c | 0.349d |
| | Matlatzintla | 139.4d | 151.96b | 79.0d | 0.518b |
| PREC | Precoz | 154.0b | 163.62a | 87.52b | 0.518a |
| | Tardía | 170.0a | 167.86a | 97.09a | 0.398b |

VAR; Variedad, PREC; Precocidad, CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales; L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína. Medias con la misma letra por columna, no son significativamente diferentes.

Con respecto a la cantidad de L-DOPA en las variedades, con base en la MS de 30 flores se presentó en el siguiente orden: Rojita-T (81.35 mg), ICAMEX-V31-P (71.16 mg), José María-T (67.69 mg) y Matlatzintla-P (53.61 mg) (Figura 2.16 B). Con base en el contenido alto de este metabolito, las flores de haba podrían utilizarse como tratamiento natural para los enfermos de Parkinson, aunado a los demás CB que se encuentran presentes en las flores y pueden tener varias aplicaciones medicinales, como en el caso de las flores medicinales silvestres utilizadas tradicionalmente en la Península Ibérica (Barros *et al.*, 2012).

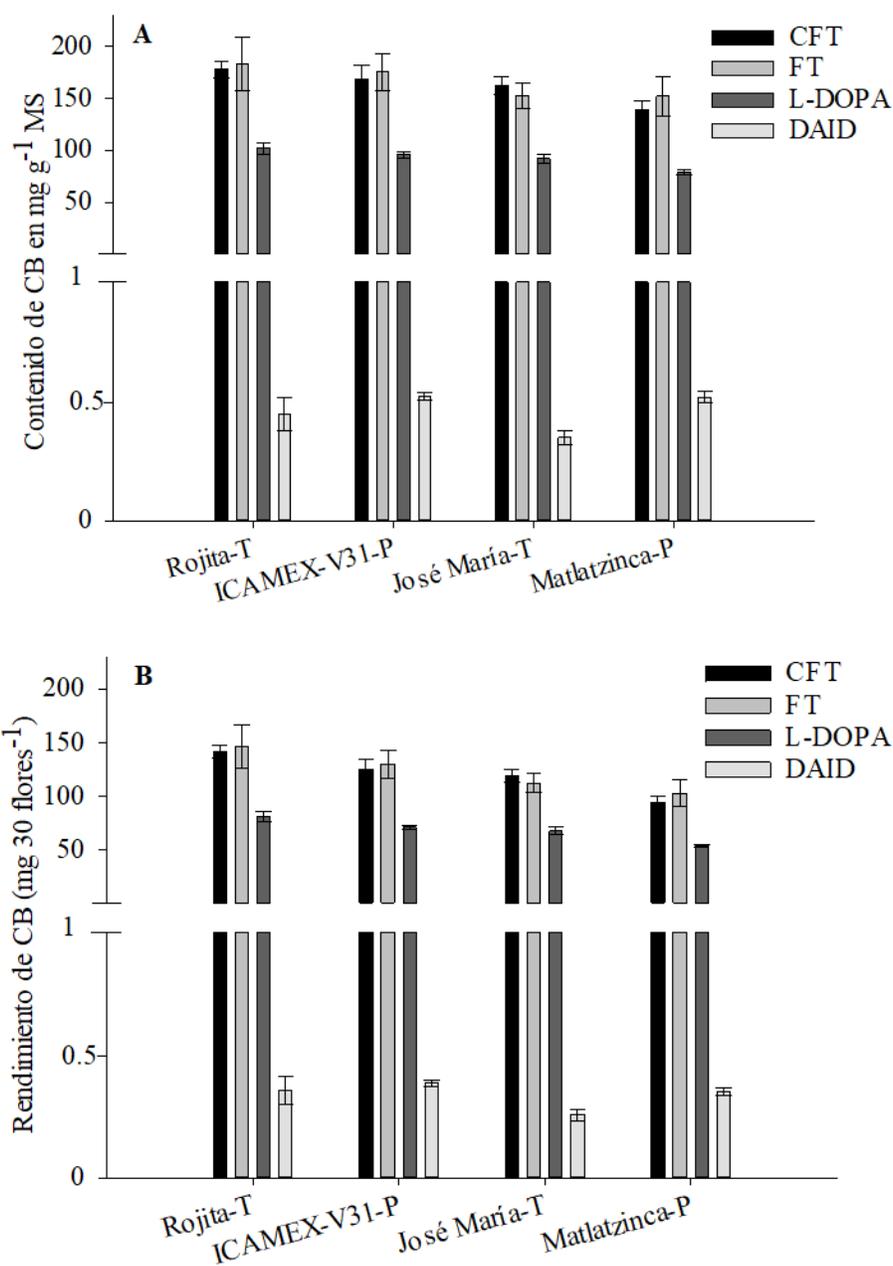


Figura 2.16 Concentración (A) y cantidad (B) de compuestos bioactivos (CB) en flores de cuatro variedades de *Vicia faba* L. sembradas en campo. T; plantas tardías, P; plantas precoces, CFT; Compuestos fenólicos totales (determinados en mg de equivalente de ácido gálico (EAG) g^{-1} MS), FT; Flavonoides totales (determinados en mg de equivalente de quercetina (EQ) g^{-1} MS); L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 3$).

Relación entre variables agroambientales y compuestos bioactivos

El análisis de correlaciones canónicas (ACC) es un modelo estadístico multivariante que predice simultáneamente las relaciones entre múltiples variables dependientes a partir de múltiples variables independientes. La técnica es descriptiva, aunque puede también ser utilizada para fines predictivos (Hair *et al.*, 2007). Pérez *et al.* (2006) predijeron la calidad de la semilla de maíz (*Zea mays*) a partir de variables de calidad física y fisiológica con el análisis de correlaciones canónicas, o en el trabajo de Ibarra-Cantún *et al.* (2018) en donde se identificó la relación existente entre variables agroambientales y el contenido de fitoquímicos en la vainilla (*Vanilla planifolia*). Así que con el ACC se quiso conocer la asociación entre variables de compuestos bioactivos (CFT, FT, L-DOPA, DAID) y variables agroambientales [temperatura (Tem), humedad relativa (HR) y la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF)] y de suelo [conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), fósforo (P), nitrógeno (N), textura] (2.2 del Capítulo II, en los subtítulos: Análisis de suelo y Variables agroambientales).

Respecto a las variables agroambientales en campo e invernadero para el ACC fueron considerados los tres intervalos de tiempo en el día (de 6:00 a 10:00 am, de 11:00 am a 14:00 pm y de 15:00 a 18:00 pm), y se consideraron todas las variables (TEM, HR, DFFF). Sin embargo, las variables de suelo no todas fueron consideradas, ya que CE, MO, N y textura se excluyeron por su colinealidad con P, de esta manera la interpretación del análisis fue más apropiada (Pérez *et al.* 2006; Hair *et al.*, 2007).

Obtención de las funciones canónicas

El análisis de correlaciones canónicas mostró que la primera y segunda función canónica, a diferencia de la función tres y cuatro, dieron una correlación alta (0.93 y 0.77) con un $r^2 = 0.87$ y 0.60 respectivamente, y con un nivel de significancia estadística alto ($p \leq 0.0001$) entre los parámetros agroambientales y de suelo, y el contenido de compuestos bioactivos en la planta de *V. faba* en cada condición de crecimiento (Cuadro 2.8). Los contrastes multivariantes de las funciones canónicas (Lambda de Wilks, Traza de Pillai, Traza de Hotelling y la mayor raíz de Roy) mostraron tener significancia estadísticamente alta ($p \leq 0.0001$) (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8 Análisis de correlaciones canónicas que relaciona variables agroambientales y de suelo con compuestos bioactivos encontrados en plantas de *Vicia faba* L.

| Función Canónica | Correlación canónica | r² canónica | Estadístico F | Probabilidad |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 0.933 | 0.871 | 20.63 | < 0.0001 |
| 2 | 0.771 | 0.595 | 8.58 | < 0.0001 |
| 3 | 0.240 | 0.058 | 1.04 | 0.391 |
| 4 | 0.050 | 0.003 | 0.17 | 0.683 |

| Estadístico | Valor | Estadístico F aproximado | Probabilidad |
|--------------------|--------------|---------------------------------|---------------------|
| Lambda de Wilks | 0.049 | 20.63 | < 0.0001 |
| Traza de Pillai | 1.526 | 10.34 | < 0.0001 |
| Traza de Hotelling | 8.292 | 32.67 | < 0.0001 |
| Raíz de Roy | 6.757 | 113.19 | < 0.0001 |

De acuerdo al cálculo del índice de redundancia (Anexo 2.6A) los valores teóricos de la primera función canónica, muestra que son importantes (0.649 y 0.290). Mientras que la segunda función canónica presentó índices de redundancia bajos (Cuadro 2.9). Por lo que la primera función canónica explica significativamente una gran parte de la varianza a diferencia de la segunda función.

Cuadro 2.9 Índices de redundancia para la primera y segunda función canónica

| Variables | Carga media elevada al cuadrado | r² | Índice de redundancia | Carga media elevada al cuadrado | r² | Índice de redundancia |
|----------------------------|--|----------------------|------------------------------|--|----------------------|------------------------------|
| | <i>Primera función</i> | | | <i>Segunda función</i> | | |
| Agroambientales y de suelo | 0.745 | 0.871 | 0.649 | 0.030 | 0.595 | 0.018 |
| Compuestos bioactivos | 0.332 | 0.871 | 0.290 | 0.316 | 0.595 | 0.188 |

Con base en la significancia estadística, los contrastes de significancia y al análisis de redundancia, se acepta la primera y segunda función canónica en donde la primera explica el 57.06 % de la

varianza y la segunda el 38.99 % de la varianza (Figura 2.17). Para la interpretación de los valores teóricos canónico se utilizó el cálculo de las cargas cruzadas canónicas (Anexo 2.7A), ya que proporcionan una medida más directa de las relaciones entre las variables dependientes e independientes (Badii *et al.*, 2007; Hair *et al.*, 2007). En donde la interpretación del plano de las dos primeras dimensiones (Cruz-Cano y Mei-Ling, 2014), presentó que las dos primeras funciones del análisis de correlaciones canónicas explicaron 96.05 % de la varianza total. Además, se muestra que los valores teóricos de las cargas cruzadas canónicas de las variables agroambientales y de suelo y los compuestos bioactivos, muestran una correlación positiva fuerte entre DFFF y DAID. Por lo que, a mayor densidad de flujo de fotones, mayor contenido de daidzeína. Mientras que Tem y P presenta una correlación negativa fuerte con DAID y L-DOPA, así que estas variables tienen una correlación inversa con estos dos compuestos bioactivos, ya que a mayor contenido de fósforo y mayor temperatura menor contenido de DAID y L-DOPA (Figura 2.17).

Los resultados obtenidos con el ACC coinciden con los resultados obtenidos en el estudio ya que DAID presenta mayor contenido en las plantas que se desarrollaron en campo, en donde se presenta una intensidad de luz mayor en comparación con invernadero, que tuvo una reducción de la transmisión de luz al cultivo por contar con una cubierta de plástico de 20 % de sombreo (720 galgas (180 micras de espesor). Mientras que con una temperatura alta y mayor contenido de fosforo en el suelo hay una disminución de L-DOPA, como lo que se obtuvo en invernadero.

En el caso de la variable HR no presentó alguna correlación con los CB, así como se demostró con la producción de compuestos fenólicos totales en la especie *Vanilla planifolia*. En donde también como en este trabajo, se cuantificaron algunos fitoquímicos en las estructuras de la especie en dos condiciones distintas de cultivos (Ibarra-Cantún *et al.*, 2018).

Como en el trabajo de John *et al.* (2017), este estudio evidencia la importancia de analizar la influencia de las condiciones de crecimiento de *V. faba* en la composición del contenido de compuestos bioactivos, dado que proporciona una mejor comprensión de donde crecer el material vegetal para obtener mayor valor agregado.

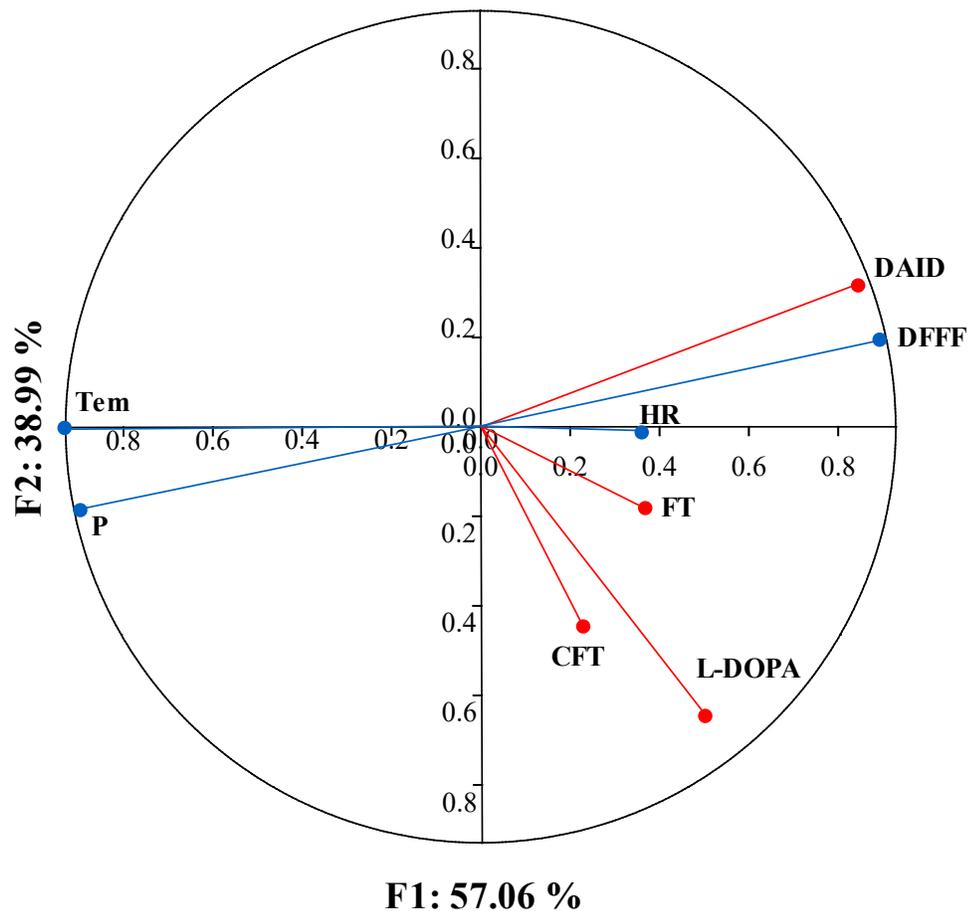


Figura 2.17 Representación gráfica de los valores teóricos de las cargas cruzadas canónicas de las dos primeras funciones en la interacción de variables agroambientales y de suelo (●) y compuestos bioactivos (●) de las plantas de *Vicia faba* L. Temperatura (Tem), humedad relativa (HR), densidad de flujo de fotones (DFFF), fósforo (P), compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4 dehidroxifenilalanina (L-DOPA) y daidzeína (DAID).

Los resultados en el estudio evidenciaron en qué etapa del desarrollo de la planta o en que tejido se encuentren los contenidos mayores de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, L-DOPA y daidzeína. Además, demostró bajo qué condiciones agroambientales se pueden obtener, que cantidades se pueden encontrar, para que estos tejidos puedan ser aprovechados para la obtención de compuestos bioactivos y su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, como en la enfermedad de Parkinson.

2.4 Conclusiones

Las variedades de haba mexicanas Rojita, ICAMEX-V31, José María y Matlatzintla mostraron tener diferencias significativas ($p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$) por variedad, precocidad, condición de crecimiento y por edad de la planta, en los compuestos bioactivos analizados.

Las plantas a los 10 días después de la emergencia (DDE) en promedio mostraron los contenidos más altos de CFT (125.52 mg EQAG g⁻¹ MS), FT (99.65 mg EQ g⁻¹ MS) y L-DOPA (82.58 mg g⁻¹ MS), mientras que las de 20 DDE presentaron en promedio los contenidos mayores de DAID (0.330 mg EQ g⁻¹ MS). Las flores tuvieron en promedio los contenidos más altos de todos los CB (CFT: 162.01 mg EAG g⁻¹ MS, FT: 165.74 mg EQ g⁻¹ MS, L-DOPA: 92.13 mg g⁻¹ MS, DAID: 0.458 mg g⁻¹ MS) a diferencia de las plantas, sin embargo, la cantidad más alta de los CB se presentó en las plantas de 20 DDE crecidas en campo (CFT: 146.80, FT: 141.35, L-DOPA: 108.31 y DAID: 0.833 mg planta⁻¹ MS). Las plantas cosechadas en campo presentaron contenidos mayores de todos los CB en comparación con las plantas cosechadas en invernadero.

La acumulación de CFT y L-DOPA no presentó diferencias en las plantas de las variedades de haba evaluadas en relación con su precocidad. En contraste, las variedades tardías (Rojita y José María) presentaron el contenido mayor de FT, y las variedades precoces (ICAMEX-V31 y Matlatzintla) tuvieron el contenido más alto de DAID.

El análisis de correlaciones canónicas demostró que las variables agroambientales tuvieron un efecto en los contenidos de los compuestos bioactivos, en donde la luminosidad tuvo una correlación positiva fuerte con DAID, mientras que temperatura y fósforo tuvieron una correlación inversa con DAID y L-DOPA.

Plantas de 20 DDE crecidas en campo podrían ser aprovechadas para la obtención de CB, principalmente aquellos compuestos que tienen un efecto importante como L-DOPA para el mal de Parkinson y DAID para la prevención de algunos tipos de cáncer.

2.5 Literatura citada

- Anderson J. J. B., M. S. Antony. 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutrition* 2: 489-504.
- Barros L., M. Dueñas, A. M. Carvalho, I. C.F.R. Ferreira, C. Santos-Buega. 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 1576-1582.

- Badii M. H., J. Castillo, K. Cortez, A. Wong, P. Villalpando. 2007. Análisis de correlaciones canónicas (ACC) e investigación científica. *Innovaciones de negocios*. 4: 405-422.
- Boudjou S., B. Dave O., F. Zaidi, F. Hosseinian. 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 138: 1543–1550.
- Boukhanouf S., H. Louaileche, D. Perrin. 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.
- Catalán M.J., A. Rodríguez del Álamo. 2016. Definición de la enfermedad de Parkinson. Madrid, España. Asociación Parkinson. Recuperado de <https://www.parkinsonmadrid.org/el-parkinson/el-parkinson-definicion/>
- César I. C., F. Braga C., C. D. Soares V., E. Nunan A., G. A. Pianetti, F. Condessa A., T. A. Barbosa F., L. M. Campos M. 2006. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal Chromatography B* 836: 74-78.
- Cruz-Cano R., T. L. Mei-Ling. 2014. Fast regularized canonical correlation analysis. *Computational Statistics and Data Analysis*. 70: 88-100.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2019a. Crop statistics – concepts, definitions and classifications. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/the-statistics-division-ess/methodology/methodology-systems/crops-statistics-concepts-definitions-and-classifications/en/> (Consultada el 11 de junio de 2019).
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141.
- Florán-Garduño B., C. Rangel-Barajas. 2005. Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Revisión Biomedica*. 16:273-280.
- Fuentes-Herrera P. B. 2016. Valor nutritivo y nutraceúticos en colectas de haba (*Vicia faba* L.) pertenecientes a los principales estados productores de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *campus* Puebla (COLPOS). pp 110-112.
- Fujii Y., T. Shibuya, T. Yasuda. 1991. L-3,4-Dihydroxyphenylalanine as an Allelochemical Candidate from *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. Utilis. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55:617-618.
- García, S. I. 2011. Variación en el contenido de L-Dopa y compuestos fenólicos durante el desarrollo de Semilla de *Vicia faba* L. (Tesis de maestría). Colegio de Posgraduados *campus* Puebla (COLPOS). pp 35-36.
- Gimeno C. E. 2004. Compuestos fenólicos un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista de la oficina de farmacia (OFFARM)* 23: 80-84.
- Hadacek F. 2002. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: 273-322.
- Hair J.F., Jr. R.E. Anderson, R.L. Tatham, W. C. Black. 2007. Análisis multivariante 5ª ed. Madrid: Pearson Prentice Hall.

- Herald T. J., P. Gadgil, M. Tilley. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 2326–2331.
- Huang T., G. Jander, De Vos M. 2011. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional análisis. *Phytochemistry*. 72:1531-1537.
- Hu J., S. J. Kwon, J. J. Park, E. Landry, D. S. Mattinson, D. R. Gang. 2015. LC-MS determination of L-DOPA concentration in the leaf and flower tissues of six faba bean (*Vicia faba* L.) lines with common and rare flower colors. *Functional Foods in Health and Disease*. 5(7): 243-250.
- Ibarra-Cantún D., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, R. M. Soto Hernández, V. M. Salazar-Rojas, M. I. Aguilar. 2018. Efecto de la condición ambiental del cultivo de *Vanilla planifolia* Jacks, ex Andrews sobre la concentración de fitoquímicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 24: 151-165.
- John M. K. M., F. Khan, D. L. Luthria, B. Matthews, W. M. Garrett, S. Natarajan. 2017. Proteomic and metabolomic analysis of minimax and Williams 82 soybeans grown under two different conditions. *Journal of Food Biochemistry* 41:1-8.
- John M. K. M., S. Natarajan, D. L. Luthria. 2016. Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. *Food Chemistry* 211: 347–355.
- Jung W., O. Yu, S. M. Lau, D. P. O’keefe, J. Odell, G. Fader, B. McGonigle. 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature biotechnology* 18: 208- 212.
- Kaufman P. B., A. Duke J., H. Brielmann, J. Boik, J.E. Hoyt. 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *The journal of alternative and complementary medicine* 3:7-12.
- Kirakosyan A., P. B. Kaufman, J. A. Duke, S. Warber, S. Bolling. 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). *Evidence-Based Integrative Medicine* 1:131-135.
- Křížová L., K. Dadáková, J. Kašparovská and T. Kašparovský. 2019. Isoflavones. *Molecules* 24: 1-28.
- Mazur W., H. Adlercreutz. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure & Applied Chemistry*. 70: 1759-1776.
- Miranda M., P. Chaná. 2000. Severe Off-Period Facial Dystonia in Parkinson’s Disease. *Movement Disorders* 15:163-179.
- Multari S., D. Stewart, W. R. Russell. 2015. Potential of faba bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 511 -522.
- Nagatsu T., M. Sawada. 2009. L-dopa therapy for Parkinson’s disease: Past, present, and future. *Parkinsonism and Related Disorders*. 15: S3–S8.

- Patil S. A., O. A. Apine, S. N. Surwase, J. P. Jadhav. 2013. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. *Advances in Parkinson Diseases*. 2: 81-87.
- Pérez M. C., A. Hernández L., F. V. González C., G. García de los S., A. Carballo C., T. R. Vásquez R., M. R. Tovar G. 2006. Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura Técnica en México*. 32: 341-352.
- Ramírez-Moreno, J.M., I. Salguero B., O. Romaskevycg, M.C. Duran-Herrera. 2015. Consumo de habas (*Vicia faba*) y enfermedad de Parkinson: una fuente natural de L-dopa a tener en cuenta. *Neurología* 30: 375-391.
- Randhir R., K. Shetty. 2003. Light-mediated fava bean (*Vicia faba*) response to phytochemical and protein elicitors and consequences on nutraceutical enhancement and seed vigour. *Process Biochemistry* 38: 945-952.
- Roberfroid M. B. 1996. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. *Nutrition Reviews* 54: S38-S42.
- Sharma N. 2015. L-DOPA Inhibited Early Root Growth in Rice Involves Biochemical Alterations in Macromolecules and Associated Hydrolytic Enzymes. *Annals of Plant Sciences*. 4: 1109-1115.
- Trinidad, T. P., Millillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S., Encabo, R. R. 2010. The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fiber. *British Journal of Nutrition*. 103: 569-574.
- Turco I., G. Ferretti, T. Baccetti. 2016. Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *Journal of Food and Nutrition Research* 55:283-293.
- Vered Y., J. M. Rabey, D. Palevitch, I. Grosskopf, A. Harsat, A. Yanowski, H. Shabtai, E. Graff. 1994. Bioavailability of Levodopa after Consumption of *Vicia faba* Seedlings by Parkinsonian Patients and Control Subjects. *Clinical Neuropharmacology*. 17: 138-146.
- Wang H., P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 42: 1666-1673.
- Wu K., J. Zhang, Q. Zhang, S. Zhu, Q. Shao, K. D. Clark, Y. Liu, E. Ling. 2015. Plant phenolics are detoxified by prophenoloxidase in the insect gut. *Scientific Reports*. 5:16823-1-15.
- Yu O., W. Jung, J. Shi, R. A. Croes, G. M. Fader, B. McGonigle, J. T. Odell. 2000. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiology* 124: 781-793.

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN ECONÓMICA DE UNA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA PARA EL CULTIVO DE HABA

Resumen

En el cultivo de haba comúnmente solo el fruto fresco o seco se consumen. Sin embargo, en la planta se encuentran compuestos bioactivos importantes para la prevención y/o disminución de padecimientos. En México, la producción y el consumo de haba son bajos, para incrementarlos es necesario incorporar una innovación tecnológica. El objetivo fue evaluar económicamente la producción de la planta de haba y realizar un análisis comparativo con la producción de haba verde, mediante la estimación de costos de producción y rentabilidad. Se realizó una investigación descriptiva y cuantitativa en dos localidades del municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. Bajo la técnica bola de nieve se seleccionó a productores, a quienes se les aplicó una entrevista semiestructurada. El análisis descriptivo sobre producción, labores y venta de haba se realizó con el paquete estadístico SPSS. Para el análisis de rentabilidad privada se generaron presupuestos privados que permitieron estimar los costos, ingresos y ganancias de la producción de haba y planta de haba. La ganancia que perciben los productores por el cultivo de haba verde es mínima. El ingreso depende del mercado destino y la modalidad de venta. El análisis mostró que los costos de producción de haba verde se incrementan proporcionalmente a la superficie cultivada de $\frac{1}{4}$ a 1 ha. Los productores con 1 ha registraron una mayor rentabilidad con la venta de haba verde al menudeo y mayoreo. Mientras que los productores de $\frac{1}{4}$ ha incurren en pérdidas cuando la venta es a mayoreo. Con la propuesta del cultivo de plantas de 20 días después de la emergencia, los productores mencionaron que los costos se reducirían considerablemente, porque los insumos y el número de jornales disminuirían. Con base en los costos de producción de la superficie cultivada y la densidad de plantas, se obtuvo el precio estimado de venta de la planta, que registró 70% de ganancia. La ganancia privada aumentó 104, 53 y 35% en $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y 1 ha respectivamente, en relación a la venta a mayoreo de haba verde. La innovación tecnológica del cultivo de planta de haba es una alternativa para mejorar los ingresos de las familias productoras.

Palabras claves: Costo de producción, innovación tecnológica, planta de haba, producción, rentabilidad.

Abstract

In fava bean cultivation, only the fresh or dried fruit are commonly consumed. However, the plant contains important bioactive compounds for the prevention and/or reduction of diseases. In Mexico, broad bean production and consumption are low; to increase them it is necessary to incorporate a technological innovation. The objective was to evaluate the production of the bean plant economically and perform a comparative analysis with the green broad bean production, by estimating production costs and profitability. A descriptive and quantitative research was carried out in two localities of the municipality of San Pedro Cholula, Puebla, Mexico. Under the snowball technique, producers were selected, to whom a semi-structured interview was applied. The descriptive analysis of broad bean production, labor and sale was carried out with the SPSS statistical package. For the private profitability analysis, private budgets were generated that allowed estimating the costs, income and profits of the broad bean production and the fava bean plant. The profit that producers receive from growing green broad beans is minimal. The income depends on the destination market and the method of sale. The analysis showed that the costs of green broad bean production increase proportionally to the cultivated area from $\frac{1}{4}$ to 1 ha. Producers with 1 ha recorded higher returns by selling green broad beans to the retail and wholesale. Whereas $\frac{1}{4}$ ha producers incur losses when the sale is wholesale. With the proposal of growing plants 20 days after emergence, growers mentioned that the costs would be substantially reduced because the number of inputs and wages decrease. By proposing the cultivation of plants 20 days after the emergency, the producers mentioned that costs would be reduced considerably, because inputs and the number of wages would decrease. Based on the production costs of the cultivated area and the density of plants, the estimated sale price of the plant was obtained, which registered a 70% profit. Technological innovation of growing fava bean plants is an alternative for improving the income of producer's families.

Keywords: *Fava bean* plant, profitability, production, production cost, technological innovation.

3.1 Introducción

En México la agricultura es un sector productivo importante, ya que prácticamente toda la producción de alimentos proviene del sector primario, es una actividad fundamental en el medio rural, en el que habita aproximadamente 37 % de la población nacional (CEDRSSA, 2014). En

2018, el valor total de la producción nacional de los cultivos fue de US \$ 32, 196, 201.35, en donde la suma de haba (*Vicia faba* L.) verde y haba grano aportaron al PIB agrícola 0.13 % (US \$ 44, 149.77) (SIAP, 2018). La importancia de esta leguminosa para las regiones productoras, entre otras cosas, radica, por ejemplo, en que suele usarse principalmente para la venta y para el consumo en distintos platillos típicos en algunos municipios de los estados de Tlaxcala y Puebla (Jordán-Aguilar *et al.*, 2019; Fuentes-Herrera *et al.*, 2020). También en que es considerada una fuente rica nutricionalmente por la población.

Recientemente el papel de las leguminosas en la nutrición está retomando interés, por su contenido alto en proteínas que pueden suplir parcialmente el consumo de la carne (Multari *et al.*, 2015; Rööß *et al.*, 2018). Además, son una fuente importante de fibra dietética, contienen carbohidratos; algunos con propiedades prebióticas como los oligosacáridos que ayudan a reforzar el sistema inmune, también proveen de vitaminas del grupo B, minerales esenciales, son bajas en sodio, no contienen colesterol e importantes compuestos bioactivos (Cuadro 3.1). Estos compuestos proporcionan nutrición y beneficios al consumidor porque pueden prevenir la incidencia de enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cierto tipo de cáncer, entre otras (Olmedilla *et al.*, 2010; Maphosa y Jideani, 2017). Estos aspectos los retomaron recientemente Prabhu *et al.* (2018), quienes realizaron una revisión en la que resaltan ampliamente las propiedades nutricionales y medicinales de *V. faba.*, con lo cual extienden sus aplicaciones futuras en la potencial utilización en la medicina y la agricultura.

En México existe escasa información sobre el consumo *per cápita* de haba. De acuerdo con un estudio de producción de haba en el país, se estimó que en el año de 1925 el consumo *per cápita* era de 0.957 kg, y para el año de 1989 descendió alrededor de 42 % (0.552 kg). En 1999 el consumo aparente de haba verde y haba seca fue de 0.577 kg (ASERCA, 2001).

En el 2013, Orozco *et al.* registraron un consumo *per cápita* de haba de 0.522 kg, en la actualidad no hay un referente de consumo de haba *per cápita*, no obstante, los datos anteriores demuestran que el consumo es bajo en comparación con el consumo de otras leguminosas, y muy posiblemente hoy en día continúe así.

Cuadro 3.1 Contenido nutricional y posibles beneficios de las leguminosas.

| Nutriente | Contenidos y/o especificaciones | Beneficios en la salud |
|------------------------|---|--|
| Proteínas | Contienen de entre 20 – 45 % de este macronutriente, siendo la soya y lupinos las leguminosas con los contenidos más altos. Entre las proteínas abundan las globulinas, albúminas y glutelinas. | La proteína de leguminosas contribuye a la reducción de la baja densidad lipoproteínas, un factor conocido en el desarrollo de enfermedades coronarias. |
| Aminoácidos | Tienen contenidos de aminoácidos azufrados bajos (metionina, cisteína y triptófano), pero contienen lisina en cantidades superiores a las que se encuentran en los granos de cereales. | Los aminoácidos bajos en azufre pueden mejorar la retención de calcio en comparación con las proteínas de origen animal con alto contenido de azufre. |
| Macronutrientes | Carbohidratos | Las fibras solubles forman geles viscosos en el intestino y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa. Las fibras insolubles aumentan el volumen fecal, tienen un efecto saciante al incrementar el tiempo de vaciado gástrico y además disminuyen el tiempo de tránsito intestinal, lo que favorece un efecto anticarcinogénico. |
| | Fibra dietética | Su contenido en fibra es muy alto, de entre 5 – 37 % en donde se incluye a la fibra soluble e insoluble. Previene enfermedades como la diabetes, complicaciones del corazón, cáncer de colón. |
| | Almidón resistente | Excelentes fuentes de almidón de digestión y asimilación lenta. El índice glucémico de las legumbres es bajo y esto contribuye de forma beneficiosa al control de la glucemia postprandial y el metabolismo lipídico; por lo que son adecuadas en la dieta de los diabéticos. Aumenta la saciedad y facilitan el control de la ingesta alimentaria. |

Cuadro 3.1 Continuación.

| | Nutriente | Contenido y/o especificaciones | Beneficios en la salud |
|------------------------|------------------|--|--|
| Macronutrientes | Oligosacáridos | Como los α -oligosacáridos en donde incluyen a rafinosa, estaquiosa y verbascosa. | Tienen propiedades prebióticas; estimula de forma beneficiosa el crecimiento y la actividad de bifidobacterias y lactobacilos en el colon humano. |
| | Grasas | No contienen colesterol y es baja en grasa | |
| | Ácidos grasos | Contienen ácidos grasos mono y poliinsaturados entre estos, el ácido esencial omega-6 ácido linoléico y el Omega-3 alfa ácido linoléico. | Ayudan a reducir el colesterol de baja densidad (LDL) y aumenta el colesterol de alta densidad (HDL). |
| Micronutrientes | Vitaminas | Vitaminas del grupo B como el folato, tiamina y riboflavina. | El folato es un nutriente esencial, reduce el riesgo de defectos del tubo neural como la espina bífida en bebés recién nacidos. |
| | Minerales | Contiene minerales esenciales como zinc, hierro, calcio, selenio, fosforo, cobre, potasio, magnesio y cromo. | Estos micronutrientes desempeñan importantes funciones fisiológicas, como la salud ósea, la actividad enzimática y el metabolismo del hierro, el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, la síntesis de hemoglobina y la actividad antioxidante, la síntesis de proteínas y la estabilización de la membrana plasmática. |

Elaboración propia con información tomada de Olmedilla *et al.* (2010) y Maphosa y Jideani (2017).

En el territorio mexicano de los 1.91 millones de hectáreas que se cultivan de leguminosas, que comprenden al frijol (87.61 %), garbanzo (10.16 %), haba (1.72 %), lenteja (0.42 %) y alverjón (0.07 %) (SIAP, 2018). El frijol es el que mayormente se consume con entre 8.4 kg (FIRA, 2016) y 10.1 kg *per cápita* (Gaucín, 2019), datos que generan una media de 9.2 kg *per cápita* de consumo en el país. Los últimos datos estadísticos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) informan que, en México en el año 2017, la cantidad de suministros de leguminosas secas *per cápita* es de 10.53 kg (FAOSTAT, 2019). Por lo que, el frijol es el que tiene mayor demanda (9.2 kg *per cápita*) y de acuerdo a los datos estadísticos, se puede argumentar que, de las demás leguminosas, una persona sólo consume 1.33

kg al año. Posiblemente sea garbanzo seguido de haba, lenteja y arvejón por la extensión que se cultiva de cada una de las leguminosas en México.

La información anterior evidencia que la producción y el consumo de haba en el país son bajos, siendo que es una especie que tiene potencial por su valor nutricional y funcional (Multari *et al.*, 2015; Fuentes-Herrera, 2016), además de que no ha sido valorada en su justa dimensión por sus aspectos alimentarios, médicos y agrícolas (Prabhu *et al.*, 2018).

Una manera en la que se puede contribuir a incrementar la producción y consumo de *Vicia faba* L. es con la implementación de innovaciones de tipo tecnológico, organizacional, comercial, etc. La innovación considerada un elemento importante para el desarrollo del sector agrícola, además necesario para aumentar la competitividad, entendida esta última como la capacidad de una empresa en ingresar a un mercado y poder colocarse en él (Herrera, 2006). De acuerdo a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) una innovación conlleva a la utilización y la transformación de conocimientos científicos y técnicos, para resolver problemas concretos, en donde los laboratorios y las organizaciones contribuyen notablemente y frecuentemente de manera decisiva en avances científicos y tecnológicos (Anon., 1996). Lara (1998) por su parte define que una innovación tecnológica surge cuando una sociedad adopta un producto nuevo o adopta un proceso que le permita solucionar o mejorar un problema. Herrera (2006) menciona que las innovaciones tecnológicas son las transformaciones de ideas anteriores a ideas nuevas, de esta manera cierto proceso o producto se mejora y contribuye a generar valor. En este proceso de transformación lo que era de uso tradicional es suplantado por la innovación tecnológica. Lo que da lugar a una agricultura moderna; agricultura competitiva y acorde con una lógica de mercado cuya referencia son los agronegocios. En esta agricultura se pueden encontrar inmersos distintos tipos de innovaciones tecnológicas como: organización del trabajo, mecánicas, administración y gestión agronómica, biotecnológicas, en sistemas de información, químicas, en el desarrollo tecnológico propio e institucionales.

Existen evidencias de que la innovación tecnológica en el sector agrícola ha funcionado para el beneficio de comunidades productoras; por ejemplo, los ganaderos del Valle del Mezquital de Hidalgo, aplicaron diferentes innovaciones pecuarias, como análisis de calidad de leche, ordeño mecánico, alimentación con ensilado, forraje y concentrado por separado, diagnóstico de gestación por ultrasonido, todo esto ayudó a obtener una producción de leche de mejor calidad y una mayor

rentabilidad del producto (Espejel-García *et al.*, 2016). Al igual como en el caso de los productores del grupo cafetalero de Plan de Arroyos Veracruz, quienes crearon un centro de acopio de semillas para poder generar plántulas, y de esta manera variedades resistentes a plagas y enfermedades que se adaptaran mejor a la zona. Lo que contribuyó a aumentar la rentabilidad de la producción de café y, a su vez, surgieron innovaciones como: la elaboración y aplicación de abonos orgánicos y un procedimiento para disminuir considerablemente la contaminación del agua, que favorecieron a la comunidad en general (Amaro-Rosales y Gortari-Rabiela, 2016).

Amaro-Rosales y Gortari-Rabiela (2016) mencionan que “innovar significa romper esquemas establecidos, innovar de forma inclusiva implica identificar problemas y solucionarlos con la participación de los involucrados”. De esta manera al involucrar a las instituciones de investigación, productores y a organizaciones gubernamentales con el cultivo de haba, se puede realizar una innovación tecnológica que proporcione una alternativa para mejorar la rentabilidad, y a su vez, que los productores puedan incorporarla con mayor fiabilidad.

El haba puede tener un aprovechamiento integral, ya que en los tejidos de la planta se encuentran metabolitos que pueden prevenir enfermedades crónicas degenerativas o utilizarlos como parte del tratamiento de enfermedades como son: los compuestos fenólicos, flavonoides, L-DOPA y daidzeína, que han sido evaluados en los Capítulos I y II. *V. faba* podría ser propuesta como una planta medicinal, con base en los contenidos de compuestos bioactivos obtenidos en las plantas y flores. Por tanto, la producción de haba podría orientarse una parte al consumo como alimento, hacia donde tradicionalmente se orienta la cadena productiva, y otra, tener la alternativa de producir planta de haba para la obtención de los compuestos bioactivos para la elaboración de complementos alimenticios y generar mayor valor agregado en la cadena productiva y mejorar los ingresos del productor primario.

Para valorar su posible viabilidad, se requiere evaluar la rentabilidad de la innovación tecnológica, de esta manera conocer las utilidades que esta nueva práctica les podría proporcionar a los productores de haba. De igual manera como se ha realizado en otros cultivos, en donde se estudió el sistema de producción para obtener la rentabilidad del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.) y chile (*Capsicum annum.*) en el municipio de Morelos, Zacatecas (Carrillo-Martínez *et al.*, 2019), o como en la producción apícola, en donde se estudiaron los costos y la rentabilidad

del proceso de la producción de la miel en los principales estados productores de México (Magaña y Leyva, 2011).

Este estudio socioeconómico es importante para conocer la rentabilidad que tiene la producción de haba verde y la planta de haba como la innovación tecnológica que busca incorporarse, ya que indica el grado de competitividad que puede alcanzar un sistema de producción, una empresa, entre otros (Magaña y Leyva, 2011). El propósito del estudio no busca omitir la producción de haba como alimento, sino hacer un uso más integral, al utilizar los tejidos de la planta para la obtención de compuestos bioactivos e incorporar una innovación tecnológica que permita generar agregación de valor al cultivo. La L-DOPA se encuentra en la planta de haba (Vered *et al.*, 1994; Etemadi *et al.*, 2018) y es considerada una fuente biológica para su producción (Patil *et al.*, 2013). Que, aunque no se ha comercializado aun, se ha demostrado que el consumo de plántulas tiene un efecto similar al del fármaco para tratar el mal de Parkinson (Vered *et al.*, 1994).

Al conocer la limitada situación actual del haba, se puede potenciar su producción, uso y consumo con la extracción de L-DOPA o la elaboración de un producto natural, lo que podría ser una oportunidad para su futuro comercio. Como es el caso en la especie *Mucuna pruriens* que se utiliza como tratamiento natural para los enfermos con Parkinson (Cassani *et al.*, 2016). En la actualidad hay productos que se comercializan como suplementos dietéticos, e incluso indican que una capsula del extracto de grano de *Mucuna pruriens* aporta 15 % de L-DOPA (52.5 mg) (Piping Rock, 2020). De esta manera *V. faba* podría representar una importante fuente de ingresos para los productores y contribuir al desarrollo agrícola rural del país (FAO, 2020).

En México no existen investigaciones sobre la rentabilidad de la producción de haba ni de la planta. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar económicamente la producción de la planta de haba y realizar un análisis comparativo con la producción de haba verde mediante la estimación de costos de producción y rentabilidad. Se realizó la estimación de costos de producción y rentabilidad de planta de haba (plantas de 20 días después de la emergencia) bajo dos sistemas de producción, en campo e invernadero, y de producción de haba verde en campo. La importancia de conocer la rentabilidad de la producción de haba verde, radica en la generación de conocimiento sobre qué tan redituable es la producción del cultivo para los agricultores. En tanto que, el conocer la rentabilidad de la producción de la planta, reflejará además de la utilidad económica, una nueva innovación tecnológica agrícola posible en el cultivo de haba que pudiera ser aplicada por los

agricultores. Principalmente en las zonas en donde se cultiva la especie o en otras en donde se pudiera adoptar y bajo los distintos sistemas de producción campo e invernadero. La hipótesis que se planteó fue, la innovación tecnológica para la producción de planta de haba en campo es más rentable que la producción de haba verde y la producción de planta en invernadero.

3.2 Metodología

Se realizó una investigación descriptiva y cuantitativa, en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan, del municipio de San Pedro Cholula, Puebla. El estudio se basó en entrevistas directas semiestructurada en las que se utilizó una guía de preguntas previamente elaborada. Se realizó un muestreo no probabilístico dirigido mediante la referenciación de los propios productores, con la técnica de bola de nieve. De esta manera se entrevistaron a seis productores de haba, con el criterio de que el productor tuviera como mínimo diez años de sembrar el cultivo. Las entrevistas fueron realizadas durante el primer semestre de 2020 con una duración en promedio de dos horas.

Guía de entrevista

Previo a la elaboración final de la guía de entrevista, a un productor de haba se le realizó una entrevista piloto amplia para conocer la forma en que cultivan la leguminosa. Con la información recabada, se diseñó la guía estructurada de preguntas para poder entrevistar a los productores sobre el proceso que realizan en la siembra y cosecha del cultivo de haba, además de los costos de inversión y de operación que le genera.

La guía constó de un cuestionario con preguntas cerradas y abiertas que ayudaron a captar la información proporcionada por los productores. Para recabar la información necesaria y abordar el objetivo de estudio, se incluyeron los cuatro apartados siguientes; *datos personales*, para conocer edad, escolaridad y información general del productor. *Conocimiento del cultivo de haba*, para saber el tiempo que tiene cultivando el haba, las características de su semilla, cuando realiza la siembra y cosecha, entre otras. *Labores y costos durante el cultivo de haba*, para conocer detalladamente las labores del cultivo que realizan desde la preparación del terreno hasta su cosecha, cómo las realizan, los implementos, insumos y jornales que utilizan en cada etapa de labor y los costos que le genera. *Producción y venta de haba*, en este apartado se preguntó el

rendimiento por la superficie cultivada y el ingreso que obtienen por su producción. En el Anexo 3.1A se muestra la guía que se utilizó para las entrevistas en este estudio, titulada “Labores y costos de producción del cultivo de haba verde”.

Análisis de la información

La información obtenida de las entrevistas se capturó en una hoja de cálculo en Excel para generar la base de datos. Las preguntas cerradas fueron codificadas, mientras que, en las preguntas abiertas, las respuestas se categorizaron para posteriormente ser codificadas. La base de datos se exportó al paquete estadístico Statistical Package for the Social Science (SPSS v19) para realizar el análisis descriptivo sobre la información obtenida de la producción de haba.

El análisis de rentabilidad privada se realizó con base en la metodología de Matriz de Análisis de Política (MAP) propuesta por Monke y Pearson (1989), mediante la cual se generó un presupuesto privado integrado por una matriz (Anexo 3.2A) que permitió estimar los costos, ingresos y ganancias de un sistema de producción o un cultivo. Para el cálculo de costos, ingresos y ganancias se realizó la conversión de pesos a dólares; se consideró el tipo de cambio del dólar del día 11 de febrero del 2021 en el que se encontraba a \$ 19.91.

La rentabilidad privada se define como el nivel de ganancia extraordinaria que obtiene el productor como proporción de los costos totales. Los costos de producción totales se clasifican en insumos comerciables, insumos indirectamente comerciables y factores internos.

Los insumos comerciables, se cotizan y comercializan en el mercado nacional o internacional, un ejemplo de ellos son los insumos (fertilizantes, plaguicidas, implementos, etc.); los insumos indirectamente comerciables, son productos que se pueden comercializar compuestos por partes comerciable y no comerciables (como la maquinaria); y los factores internos, son componentes que no se comercializan internacionalmente y su precio se define en el mercado nacional, tales como la mano de obra, tierra, agua, capital, seguro, servicios etc. (Monke y Pearson, 1989; Charpantier y Mora, 1999).

La matriz se elaboró con base en la información obtenida de las entrevistas a productores: labores (siembra, deshierbe, control de plagas, fertilización, aporcar, cosecha), número de jornales, insumos (fertilizantes, plaguicidas, herbicidas), implementos, equipo, volumen de producción y precios del haba. Los presupuestos se calcularon tomando en consideración los precios privados

es decir los precios actuales en el mercado. Para los costos de los implementos y equipo se calculó su depreciación con base en su vida útil.

Una vez que se identificaron las actividades, insumos y productos, estos se clasificaron como bienes comerciables y factores internos, considerando que en el sistema de producción de haba no hay bienes indirectamente comerciables. Para determinar los coeficientes técnicos (datos de campo) de la matriz de costos de producción se empleó la media aritmética, por ejemplo: el número de jornales, cantidad de insumos e implementos, volumen de producción, precios de kilogramo de haba verde, etc.

La rentabilidad privada se estimó a partir de tres indicadores que a continuación se explican:

1. Costos de producción totales. Es la suma de los costos de insumos comerciables e indirectamente comerciables y factores internos. Representan el total de inversión que realiza el productor en un ciclo productivo. La estructura de costos muestra los niveles de insumos en función de la tecnología empleada en el cultivo.

$$\begin{array}{l} \text{Costo de producción a precios} \\ \text{privados} \end{array} \qquad \text{CP} = \text{B} + \text{C} \qquad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

CP: costos de producción de precios privados

B: costos de insumos comerciales e indirectamente comerciales

C: factores internos

2. Ganancias privadas. Es el beneficio privado neto que obtiene el productor después de pagar los costos totales de producción (bienes comerciales, indirectamente comerciales y factores de la producción). Es igual a la diferencia entre el ingreso privado, menos el costo de los insumos comerciables e indirectamente comerciables y los factores internos de la producción. Esta se estima con base en los precios de mercado, es decir, los ingresos y costos enfrentados por el productor (Cuadro 3.2).

$$\text{Ganancias privadas} \qquad \text{D} = \text{A} - \text{B} - \text{C} \qquad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

D: ganancias privadas

A: ingreso privado

B: costo de los insumos comerciables e indirectamente comerciables

C: factores internos

3. Rentabilidad privada. Este indicador representa el nivel de ganancia extraordinaria que obtiene el productor como proporción de los costos totales (Franco *et al.*, 2018). Es la relación entre la ganancia privada y los costos totales de producción. Para su determinación se emplea la siguiente fórmula:

Rentabilidad privada

$$RP = D / B + C$$

Ecuación 3

Donde:

RP: rentabilidad privada

D: ganancias privadas

B: costo de los insumos comerciables e indirectamente comerciables

C: factores internos

Cuadro 3.2 Matriz de análisis de política. Rentabilidad Privada.

| | Ingresos | Costos comerciables e indirectamente comerciables | Factores internos | Ganancias |
|------------------|----------|--|----------------------|-----------|
| Precios privados | A | B | C | D |

Fuente: Matriz de Análisis de Política (Monke y Pearson, 1989).

3.3 Resultados y Discusión

Datos de los entrevistados La tenencia de la tierra de los entrevistados es en propiedad privada.

La principal ocupación de los entrevistados fue la de ser agricultores. La edad de los agricultores fluctúa entre los 50 y 64 años, con un promedio de 56 años y una mediana de 55. En escolaridad 50 % mencionó tener secundaria, 33.33 % comentó haber estudiado solo la primaria y el resto tiene licenciatura terminada (16.66 %). La tenencia de la tierra de los entrevistados es en propiedad privada, la mayoría (66.66 %) destina media hectárea para sembrar haba, 16.66 % destina un cuarto de hectárea y el otro 16.66 % siembra una hectárea de haba. La producción del cultivo es bajo

monocultivo. El tiempo que llevan cultivando haba varía de 10 a 30 años. Los entrevistados también siembran otros cultivos como calabaza (*Curcubita pepo*), rábano (*Raphanus sativus*), cempasúchil (*Tagetes erecta*), cebolla (*Allium cepa*), cilantro (*Coriandrum sativum*), chiles (*Capsicum spp*), etc. para complementar su ingreso económico.

Conocimiento del cultivo de haba

En San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan, municipio de San Pedro Cholula, Puebla el cultivo de haba se realiza a campo abierto una vez al año. En las localidades conocen los cultivares haba ejotera y criolla amarilla, sin embargo, la mayoría (83.33 %) solo siembra el haba ejotera y el resto ambos. Los entrevistados mencionaron que siembran principalmente el haba ejotera porque es un cultivar que rinde más, ya que a pesar de que la semilla es pequeña la vaina en verde suele ser grande de (15 a 20 cm) y llega a desarrollar hasta 6 granos a diferencia de la criolla amarilla que solo desarrolla hasta 3 granos (Cuadro 3.3). Además, el haba ejotera suele cosecharse en verde ya que es consumida como verdura, mientras que la criolla amarilla suele consumirse en seco, ya que al comercio le gusta porque es una variedad que cuando la cocinan espesa más que el haba ejotera. Con base en la percepción de los agricultores, en el Cuadro 3.3 se presenten algunas de las características de los cultivares.

Cuadro 3.3 Características de los cultivares de haba que siembran en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan, municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México.

| Características | Haba ejotera | Criolla amarilla |
|--|--------------------------------|------------------|
| Tamaño | pequeña | mediana |
| Color de testa (cáscara) | verde | verde |
| Color de grano (cotiledón) | amarillo claro, casi blanca | amarillo |
| Número de granos por vaina | 4 a 6 | 2 a 3 |
| Floración (días después de la siembra) | 80 - 90 | N.D. |

*N.D. No disponible

De manera similar a lo descrito por los entrevistados, Etemadi *et al.* (2015) mencionan que el tamaño de semilla varía entre distintas variedades y cultivares de habas, entre estas, Aquadulce, Bell Bean, D' Aquadulce, Delle Cascine, Early violetto, Early White, Sweet lorance y Windsor, y

de acuerdo a su peso se clasifica como semillas grandes ($>1.0 \text{ g}\cdot\text{semilla}^{-1}$), medianas ($0.5\text{--}1.0 \text{ g}\cdot\text{semilla}^{-1}$) y pequeñas ($<0.5 \text{ g}\cdot\text{semillas}^{-1}$). Los tipos de semillas pequeñas (*Vicia faba* var. Minor) se utilizan comúnmente para el consumo humano y la alimentación animal, mientras que los tipos de semillas mediano y grande (*V. faba* var. Major) se utilizan para el consumo humano, ya sea en verdes o secas. Las vainas miden de 15-20 centímetros de largo y a menudo contienen de 3 a 6 semillas planas y ovaladas que pueden ser blancas, amarillas, verdes o moradas.

En las localidades de estudio, ubicadas en el poniente del Estado de Puebla, acostumbran a sembrar el haba desde finales del mes de agosto hasta mediados del mes septiembre, la mayoría cosecha entre enero y febrero (83.33 %) y el resto suele cosechar en marzo y abril. Los productores trabajan la tierra en condiciones de riego con agua de pozo. El haba que cosechan es en verde y dejan secar la que no se vende o la que se destina para semilla. Mientras que en otras comunidades al oriente del estado de Puebla (San José Llano Grande, San Miguel Zoapan, Tlachichuca, Ciudad Serdán) los productores de haba siembran en los meses de febrero y marzo, sus tierras las trabajan bajo temporal y cosechan el haba en estado maduro (seco) (Rojas-Tiempo *et al.*, 2011), que principalmente se destina para la venta y para el consumo en la región en distintos guisos como “xolostle” (guiso tradicional de habas con epazote), habas con nopales y tortita de haba con o sin camarón (Fuentes-Herrera *et al.*, 2020).

Labores durante el cultivo de haba

Aunque las localidades de estudio se encuentran muy cerca una de otra, las labores que realizan durante el cultivo de haba suelen variar entre agricultores, sin embargo, son unidades de producción que se caracterizan por realizar prácticas tradicionales (Rojas-Tiempo *et al.*, 2012). Para la preparación del terreno comentaron que siguen cuatro etapas: se rastrea, se ara, se vuelve a rastrear y por último se surca. Todos los agricultores utilizan tractor y solo una minoría (16.66 %) también utiliza la yunta para surcar el terreno. La distancia entre surcos varía de 80 o 90 cm y 70 cm entre matas, la mayoría (83.33 %) deposita de 2 a 3 semillas por mata, mientras que el resto deposita de 3 a 4 semillas. El método de siembra es a pala (golpe), así es como tradicionalmente suele sembrarse en las regiones productoras de los Estados de Puebla y Tlaxcala (Rojas-Tiempo *et al.*, 2012). En la siembra, la familia suele ayudar, además de contratar jornales. La cantidad de jornales contratados depende de la superficie cultivada. Los productores de haba suelen fertilizar el cultivo con fertilizantes químicos como pueden ser triple 17, sulfato de amonio y urea. Algunos

productores también utilizan fertilizantes orgánicos como la pollinaza (excreta de los pollos) o el abono del ganado (estiércol), el cual suele colocarse previo a la siembra. La fertilización se realiza al mes o mes y medio de nacida la planta y cuando se encuentra en estado de floración. Aunque los agricultores también mencionaron que la primera fertilización se realiza de acuerdo a como se observen las necesidades de la planta, ya que “si se ve bonita la planta”¹ no se le aplica fertilizante sino hasta la floración.

Las enfermedades más comunes presentadas en el cultivo de haba son roya (*Uromyces*), pudrición de raíz (*Fusarium*) y la mancha de chocolate (*Botrytis fabae*), siendo esta última la de mayor incidencia presentada en las etapas fenológicas críticas como la floración y fructificación (Rojas-Tiempo *et al.*, 2011). Enfermedad causada por el hongo *Botrytis fabae*, la planta comienza con pequeñas manchas de color marrón rojizo en las hojas y en el tallo, pero en etapa agresiva las lesiones se fusionan y quedan cubiertas por un micelio esponjoso que provocan manchas grandes que cubre el tejido, se vuelve necrótico y muere (Etemadi *et al.*, 2015). Todos los entrevistados mencionaron que al cultivo se le aplica un fungicida, desde que empieza la planta a desarrollarse (alrededor de los 25 días de crecida) y algunos otros productores también fumigan el cultivo cuando inicia la floración. Entre los fungicidas empleados mencionados están el Folicur, Thiram, Quintozeno y Terrazole. Respecto al uso de herbicidas, solo la minoría (16.66 %) comentó que utilizan el herbicida paraquat.

Entre las plagas más incidentes en el cultivo se encuentra el pulgón seguido del gusano y el chapulín (Rojas-Tiempo *et al.*, 2011). El pulgón (*Aphis fabae*) es un insecto pequeño de diferentes colores dependiendo de la planta hospedante, se puede localizar en las hojas y/o en los tallos de la planta (Etemadi *et al.*, 2015). El pulgón, extrae la savia de las hojas, y va dañando a la planta que propicia la infestación de hongos como la roya y la mancha de chocolate (Rojas-Tiempo *et al.*, 2011). Los entrevistados mencionaron que suelen utilizar plaguicidas cuando se observa la presencia de alguna plaga (animales masticadores) y en el periodo de la floración. Entre los plaguicidas que suelen utilizar esta el Tirano (MEZFER), Malatión (VERSA®), Foley (Dragon) y Furadan (Farmagro).

Durante el desarrollo del cultivo de haba, todos los entrevistados afirmaron que suelen quitar tres veces la maleza (deshierbar). En la cosecha, además de que ayuda la familia en esta labor, también

¹ Planta vigorosa, de color verde intenso.

se contratan jornales. El número de jornales contratados depende de la producción y del corte que se esté realizando, debido a que suelen realizar durante la cosecha de 4 a 8 cortes con una media de 5 cortes. Para una mejor apreciación de las labores que se realizan en el cultivo de haba se conjunto la información de los entrevistados la cual se describe en el Cuadro 3.4.

Cuadro 3.4 Labores, herramientas y maquinaria utilizada en el cultivo de haba en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapecpan pertenecientes al municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México.

| Práctica | Herramienta o maquinaria que utilizan en la práctica | Entrevistados que lo utilizan (%) | Descripción del proceso |
|---------------------------------|---|--|---|
| Preparación del terreno | Tractor | 100 | Se rastrea para triturar toda la maleza, se segunda o ara para que la maleza quede a mayor profundidad, se vuelve a rastrear para emparejar el suelo y al último se surca para sembrar. |
| | Yunta | 16.66 | Para surcar |
| Siembra | Pala | | Se depositan de 2 a 4 semillas por mata, principalmente 3, dependiendo de las semillas que tome la mano |
| Aplicación de algún agroquímico | Bomba manual, de gasolina o eléctrica | 100 | Principalmente se utiliza para fumigar o colocar el fungicida a la planta |
| Deshierbe | aros o azadón | 100 | Se realiza a mano y se suele realizar tres veces durante todo el desarrollo del cultivo de haba. La primera es al mes de la siembra, después a los 20 días y por último cuando melgan. |

Producción y comercialización de haba

Para tener un mejor análisis y criterio sobre la producción que obtienen los productores de haba por superficie cultivada, se consideraron tres categorías, en la primera son productores que destinan $\frac{1}{4}$ ha para la siembra de haba; la segunda categoría son productores que destinan alrededor de $\frac{1}{2}$ ha y la tercera categoría siembran 1 ha de haba. Los productores mencionaron que tienen una

producción de 3 a 10 toneladas de haba, la cual está en función de la superficie que cultivan, a mayor superficie de siembra del cultivo de haba, mayor es la producción (Figura 3.1). Sin embargo, se detectó que independientemente de la superficie que siembran hay diferencias en el rendimiento, ya que este no tiende a ser proporcional. Este aumento o baja de producción, es debido al manejo del cultivo, al número de cortes que realizan los productores durante la cosecha, si el cultivo presento o no algún daño provocado por enfermedad o plaga y por efectos de factores ambientales durante su desarrollo que reducen la producción.

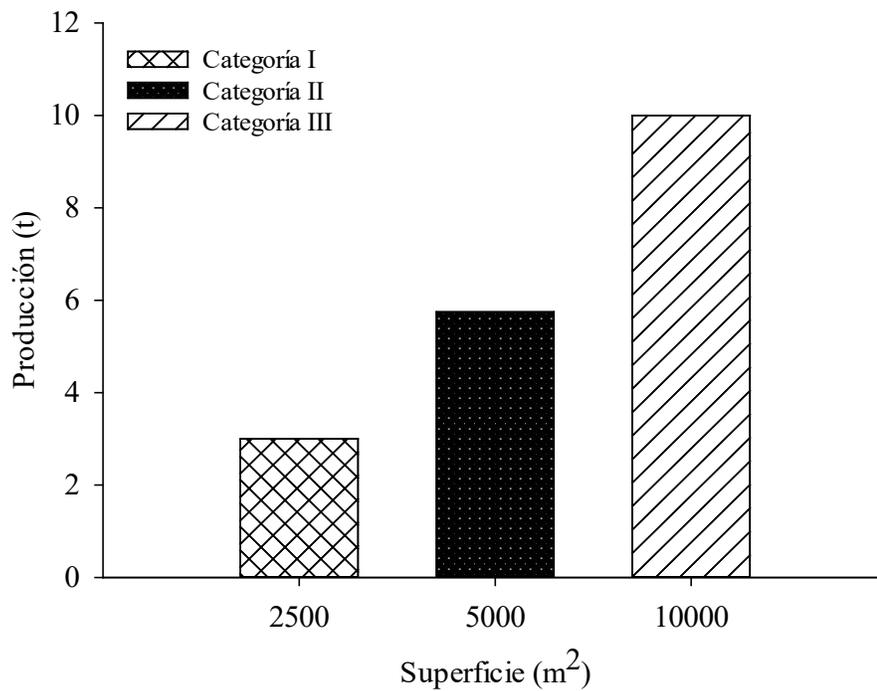


Figura 3.1 Valores medios de producción de haba verde por superficie cultivada en las localidades de San Agustín Calvario y San Gregorio Zacapechpan, municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México.

Los entrevistados registran rendimientos superiores de haba verde al promedio registrado por productores en el Estado de México que es de 6 t ha⁻¹ (Pérez *et al.*, 2015). Rendimientos que también fueron mayores a los obtenidos en cultivares evaluados por Pichardo-Riego *et al.* (2013), que extrapolando los valores llegan a obtener entre 4.5 - 9.2 kg ha⁻¹, excepto con el cultivar cochinerá morada que tuvo un rendimiento similar (10.3 kg ha⁻¹) a lo mencionado en este estudio por los agricultores que siembran una hectárea de haba. Estas diferencias encontradas en el rendimiento del cultivo de haba, además de otros factores, pueden deberse a las condiciones

ambientales que prevalecen en la localidad, ya que Pérez *et al.* (2015) indican que los rendimientos de 35 cultivares de haba sembradas en tres localidades del Estado de México con características ambientales y geográficas distintas (San Francisco Oxtotilpan, San Nicolás Guadalupe y San Diego) tuvieron un rendimiento medio de 10.57, 7.49 y 11.36 t ha⁻¹ de vaina verde, respectivamente.

Respecto a la venta de haba verde, la mayoría de los agricultores (83.33%) suelen vender en la central de abastos de Puebla, mientras que el resto la vende en la central de abastos de la Ciudad de México. Casi todos venden a mayoreo y en promedio venden a US \$0.40 por kilo, solo algunos venden a menudeo, con un precio promedio a US \$0.62 el kilo. Los entrevistados comentaron que la ganancia que perciben por el cultivo de haba es muy poca, lo perciben como autoempleo², pues incorporan la mano de obra familiar, sin pago real, aunque para fines del análisis económico se consideró el costo de oportunidad de los jornales familiares. Además, todos los entrevistados coincidieron que el ingreso que obtienen por la venta de haba verde, principalmente depende de cómo se esté comercializando³, a qué mercado la destinan para vender y la modalidad de venta si es al menudeo o mayoreo.

A pesar de que los productores entrevistados mencionaron que el cultivo de haba no les reditúa económicamente, comentaron que siguen cultivando el haba por gusto (16.66 %), porque cuentan con la semilla (33.33 %), por costumbre o tradición (33.33 %) y por estrategia (16.66 %), ya que por temporada de invierno no pueden sembrar otro cultivo como tomate, calabaza o ejote.

Costos y rentabilidad de la producción de haba

Con base en los tres indicadores: costos de producción total, ganancia privada y rentabilidad privada, se estimó el análisis de rentabilidad privada de acuerdo a la superficie sembrada por los productores de haba. Los costos de producción generados bajo las tres categorías se pueden observar de manera resumida en la Figura 3.2, en donde tanto los agroquímicos; fertilizantes químicos y orgánicos, fungicidas y plaguicidas, como la mano de obra; siembra, deshierbe, fertilización, plagas y cosecha, representaron los porcentajes de mayor gasto en la producción de haba verde. Mientras que materiales diversos; manguera de nylon, pala, azadón, bomba para

² Invierten su dinero en la siembra, recuperando lo invertido y además obteniendo una mínima ganancia.

³ Como se encuentre el precio por kilo de haba.

fumigar, y preparación del terreno; manejo del tractor por hora, representaron los gastos de menor porcentaje. Los costos de producción fueron incrementándose de acuerdo a la superficie cultivada de ¼ a 1 ha (US \$1, 254.44 a US \$2, 953.28, respectivamente) (Cuadro 3.5).

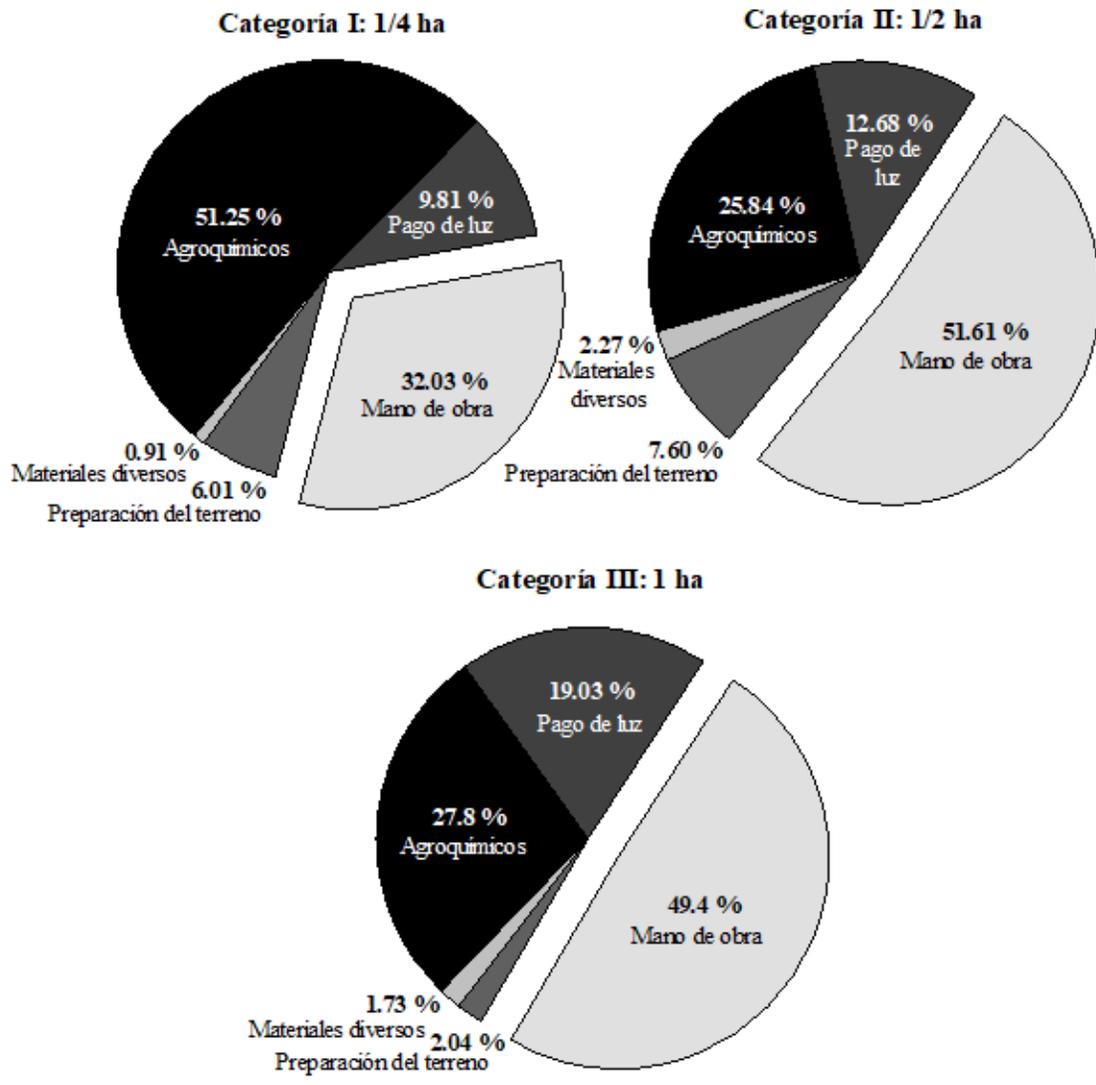


Figura 3.2 Síntesis de costos de producción de haba verde por categoría de productor.

Cuadro 3.5 Ganancias económicas de la producción de haba verde por superficie y modalidad de venta.

| Superficie sembrada (m ²) | Costos de producción (US \$) | <i>Menudeo</i> | | | <i>Mayoreo</i> | | |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Relación Beneficio costo | Ganancia Privada (US \$) | Rentabilidad Privada (%) | Relación Beneficio costo | Ganancia Privada (US \$) | Rentabilidad Privada (%) |
| 2500 | 1, 254.47 | 1.50 | 629.00 | 50 | 0.96 | -49.04 | -4 |
| 5000 | 1, 454.04 | 2.15 | 1, 685.08 | 116 | 1.38 | 554.99 | 38 |
| 10000 | 2, 955.63 | 2.12 | 3, 322.61 | 112 | 1.36 | 1, 062.44 | 36 |

Fuente: Elaboración propia con base en datos de campo.

Para medir los costos totales de una actividad primaria, los economistas consideran los costos de oportunidad, los cuales se incorporan dentro de los costos de producción (Samuelson y Nordhaus, 2010). Mankiw (2012) define a los costos de oportunidad como costos explícitos (evidentes) e implícitos (no evidentes), los costos evidentes son los costos de pagos de insumos, pagos de trabajadores, etc., mientras que los implícitos no se genera un pago en efectivo, son ingresos no percibidos, como cuando la familia contribuye a su propio negocio y las horas trabajadas no son pagadas. En el estudio se consideraron los costos de oportunidad como fue el costo del pago no retribuido a la familia. Así que los costos de oportunidad son un costo que se genera sin importar que se reflejen o no en las transacciones monetarias.

En el análisis económico de la producción de haba se detectó el costo de oportunidad del trabajo familiar. De todos los jornales que se emplean en las labores del cultivo de haba el 40, 55 y 57 % corresponden a mano de obra familiar en las categorías de ¼, ½ y 1 ha, respectivamente. Así que en todas las categorías, los costos variables asignados a los jornales se reducen y la ganancia privada aumenta. Por tal motivo el trabajo familiar en el campo es sustancial, estos gastos que no se efectúan se deberían de incorporar ya que la familia realiza un uso importante e intensivo de trabajo y tiempo. Así como en este estudio, también en la actividad lechera se evidenció la relevancia que tiene el costo de oportunidad de la mano de obra familiar, la cual es fundamental valorarla de manera explícita en la economía de la producción lechera, con el fin de mejorar su participación y hacer más eficiente su uso (Jiménez *et al.*, 2014).

Las ganancias obtenidas por los productores son diferenciadas en función de la modalidad de venta de haba verde, al menudeo se obtuvo una mayor ganancia en comparación con la venta al mayoreo. Siendo los productores que siembran 1 ha el esquema de mayor rentabilidad, ya que obtienen la mayor ganancia privada tanto a menudeo US \$3, 309.32 como a mayoreo US \$1,062.43. Mientras que los productores que siembran $\frac{1}{4}$ ha obtienen una ganancia privada mucho menor; a menudeo US \$568.70 y a mayoreo incurren en pérdidas (Cuadro 3.5). Una ganancia privada de US \$568.70 al año es un ingreso muy bajo para el productor, sin embargo, para contribuir en sus ingresos económicos suelen cultivar otros cultivos, criar animales o cuentan con alguna otra actividad. Con base en la información obtenida se destaca la importancia de los canales de comercialización, es decir vender al menudeo representa para las diferentes categorías mayores ganancias y rentabilidad.

Las tres superficies de producción muestran una relación beneficio mayor que 1 bajo el esquema de la venta al menudeo, lo cual refleja que la actividad productiva genera ingresos para cubrir los costos de producción totales y a su vez un margen de ganancia; es decir, por cada dólar invertido en la producción de haba en la Categoría III se obtienen US \$0.056 más, mientras que en la Categoría I por cada dólar invertido se obtienen US \$0.025.

Respecto al indicador de rentabilidad privada, el cual expresa la relación de las ganancias respecto a los costos de producción. Sólo las Categorías II y III registraron una rentabilidad arriba del 100 %, por lo tanto, los sistemas de producción hacen uso eficiente de los recursos.

Perspectivas sobre la producción de plantas de haba en campo y en invernadero

“Los laboratorios universitarios, los centros de investigación gubernamentales y las organizaciones sin fines de lucro pueden contribuir de manera significativa, y a veces decisiva, a los avances científicos e incluso tecnológicos...” “El cambio tecnológico implica importantes procesos de aprendizaje de tipo acumulativo. Estos procesos comprenden el aprendizaje por la práctica, el aprendizaje por el uso y el aprendizaje por la interacción. Las instituciones de investigación y las empresas representan la base institucional de ese proceso de aprendizaje (Anon., 1996)”.

La investigación es una actividad importante para la innovación tecnológica, la cual tiene dos etapas: la investigación básica, orientada a la generación de conocimiento sobre la naturaleza y la

sociedad, y la investigación aplicada que se centra en la búsqueda de una solución original de un problema o que mejore las soluciones que ya se encuentran disponibles (Lara, 1998).

La vinculación entre instituciones y el sector agrícola es indispensable. Esta conjunción de ideas podría conllevar a innovaciones tecnológicas importantes que puedan ser aplicadas en la agricultura y que logren generar una cadena de beneficios en el sector agrícola, en la economía y en la sociedad. Por tal motivo con base en los estudios previos realizados en los Capítulos I y II que comprueban que las plantas de haba tienen contenidos sobresalientes de compuestos bioactivos con función biológica importante para el ser humano. Se estableció como innovación tecnológica la propuesta de cultivar plantas de haba de 20 días después de la emergencia, con el propósito de venderlas para la obtención y uso de estos metabolitos por parte de la sociedad.

Para la aplicación del uso de tecnología agrícola se deben de considerar los aspectos económicos, sociales, culturales y ecológicos que son poco analizados en el momento de instrumentar algún tipo de tecnología, los cuales son importantes ya que son aspectos que se encuentran entrelazados (Herrera, 2006). Por tal motivo, en este estudio se quiso conocer la opinión de los productores de haba sobre producir y vender plantas de 20 días después de que emergieron, dado que ellos tienen el conocimiento tradicional, la práctica y la experiencia. Los productores hicieron los siguientes comentarios:

“Estaría muy bien porque se pudieran sembrar al año alrededor de cinco veces o más. Además se acortaría el espacio de siembra ya que no sería en surco sino se sembraría en hilera, más cerrado.” (*Daniel Mani, 13 de marzo de 2020*)

“Sería conveniente porque a los veinte días de crecida la planta se estaría aplicando solo una fertilización y un fungicida lo que generaría menos trabajo y dependiendo del costo de la planta, si podría convenir.” (*José Stanislao Mani, 13 de marzo de 2020*)

“Estaría muy bien, primero habría que germinar la semilla en un invernadero y posteriormente sembrarla en campo.” (*Roman Coyomani Cuamani, 14 de mayo de 2020*)

“Estaría muy bien, aunque posiblemente sería solo en una temporada, ya que por el clima en algún momento ya no se podría producir.” (*Luis Cuanel, 15 mayo de 2020*)

“Estaría bien si lo pagaran a buen precio, además también se tendría que ver el rendimiento que se obtiene.” (*Elezar Gutierrez Cuamani, 15 de mayo de 2020*)

“Si sería negocio, conociendo que a esa edad no tiene complicaciones.” (*Gerardo Moyotl, 15 de mayo de 2020*)

Con la propuesta de la innovación tecnológica, los entrevistados mencionaron que se tendrían que seguir casi todas las labores que comúnmente realizan con el cultivo de haba verde, sin embargo, consideran que los gastos de producción se reducirían considerablemente. Algunos estimaron que su reducción en gastos sería entre el 25 o 50 %, ya que el trabajo en campo, los insumos como agroquímicos y el contrato a jornales disminuirán. De acuerdo a lo comentado por los entrevistados, las labores de cultivo que seguirían para la producción de plantas se observan en el Cuadro 3.6.

Cuadro 3.6 Labores propuestas por los productores para el cultivo de la planta de *Vicia faba* L. de veinte días después de la emergencia.

| Labores | Si es necesario (%) | No es necesario (%) | Comentarios |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--|
| 1. Preparación del terreno | 100 | | Para el suelo se requiere lo mismo que para una siembra de haba verde. |
| 2. Siembra | 100 | | No hay necesidad de estar regando las plantas ya que para esa edad no requieren de tanta humedad, solo antes de sembrar regar bien la parcela o posiblemente con la humedad residual. |
| 3. Deshierbe | 100 | | Posiblemente se necesite un deshierbe, aunque también se propone una producción de acolchonado el cual podría ayudar a que la planta no se lastime cuando se realice el deshierbe. Sugiere la instalación de un invernadero, para germinar la planta y posteriormente sembrarla en el campo. |
| 4. Utilización de algún agroquímico | 66.66 | 33.33 | Utilizar un fungicida si fuera necesario. Además de utilizar un fertilizante orgánico para que la planta pueda ser utilizada como una planta medicinal. |
| 5. Cosecha | 100 | | |

Fuentes: Elaboración propia con información de los entrevistados.

Con base en la información recabada de las entrevistas, sobre la distancia entre surcos (en promedio cada 85 cm) y entre matas (en promedio cada 70 cm, se depositan 3 semillas), y respecto a las labores de cultivo que seguirían los agricultores para la producción de plantas. Se estimó la densidad de plantas por superficie cultivada y los costos de producción. En donde para ¼ ha se obtendría una densidad de 12, 605 plantas con un costo de producción de US \$458.36, para ½ ha se obtendrían 25, 210 plantas con un costo de producción de US \$512.80 y en 1 ha se obtendría una densidad de plantas de 50, 420 con un costo de producción de US \$705.97. Así que los costos de producción de la planta de haba se ven reducidos considerablemente 63, 65 y 76 % respectivamente, a diferencia de los costos generados por la producción de haba verde (Cuadro 3.5 y Cuadro 3.7)

Cuadro 3.7 Ganancias económicas de la producción de planta de haba por superficie cultivada.

| Superficie sembrada (m ²) | Densidad de plantas | Costos de producción (US \$) | Precio de venta de planta (US \$) | Relación Beneficio costo | Ganancia Privada (US \$) | Rentabilidad privada (%) |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2500 | 12, 605.04 | 458.38 | 0.12 | 3.33 | 1,069.57 | 233 |
| 5000 | 25, 210.08 | 512.80 | 0.06 | 3.33 | 1,196.55 | 233 |
| 10000 | 50, 420.17 | 706.01 | 0.04 | 3.33 | 1,647.35 | 233 |

Fuente: Elaboración propia con base en datos de campo.

El precio de venta se estimó a partir de los costos de producción por planta, la densidad de plantas por superficie cultivada, el contenido de L-DOPA por planta de haba (137.5 mg planta⁻¹ MS, valor medio) y el precio de referencia del mercado de productos que contienen L-DOPA, con base en las variables se determinó un nivel de ganancia del 70 %. Así que, de acuerdo a la superficie cultivada y a la densidad de plantas obtenidas se estimó el precio de venta de la planta y se obtuvo la relación beneficio costo, la ganancia privada y la rentabilidad privada para cada categoría (Cuadro 3.7). La relación beneficio costo fue de 3.33 para todas las categorías lo que significa que el productor tendría una rentabilidad de US \$ 0.11 por cada dólar invertido, la cual es superior a la relación beneficio costo de la venta de haba verde ya sea a menudeo o mayoreo (Cuadro 3.5). Así que la innovación tecnológica es más rentable que la venta de haba verde, ya que permite recuperar los costos de producción y además se tendría un margen adicional de utilidad. Estas ganancias resultaron ser atractivas para cualquier categoría, ya que en ¼ ha se obtendría una ganancia de US

\$ 1,069.56, muy similar a la de ½ ha y en 1 ha se obtiene una ganancia de 54 % mayor a la obtenida en ¼ ha (Cuadro 3.7). Con la venta de planta de haba bajos los tres sistemas de producción se obtendrían 104, 53 y 35 % de ganancia privadas mayor (¼, ½ y 1 ha, respectivamente) respecto a la venta a mayoreo de haba verde, que es como suelen venderla regularmente. Además, porque en un periodo tan corto de tiempo obtendrían una mejor ganancia que lo percibido por el cultivo de haba verde o por otros cultivos como el maíz, en donde llegan a tener utilidades de US \$ 56.63 por tonelada (Ayala-Garay *et al.*, 2013). Sin embargo, de acuerdo a lo mencionado por los productores se podrían realizar alrededor de 5 cosechas de planta de haba durante el transcurso del año, de esta manera se obtendría anualmente una mayor ganancia, lo que hace aún más atractiva la propuesta de esta innovación tecnológica agrícola. Cabe resaltar que, para que una innovación sea aplicada, es importante que los productores vean resultados para que la innovación pueda ser incorporada con mayor fiabilidad, así como sucedió con las innovaciones pecuarias en el estudio realizado por Espejel-García *et al.*, (2016).

En el cultivo de haba la densidad recomendada es de 73, 000 plantas ha⁻¹; y para alcanzarla se deben sembrar 2 semillas por mata, a una distancia de 50 cm entre matas y de 80 cm entre surcos (Rojas-Tiempo *et al.*, 2011), mientras que otros autores sugieren una densidad de 45, 000 – 60, 000 plantas ha⁻¹, esto depende del tamaño de la semilla del cultivar y de la región (Etemadi *et al.*, 2019). En las entrevistas se mencionó que si la cosecha sería a una edad de 20 días después de la emergencia la planta podría ser sembrada en hilera, de esta manera la densidad de planta se incrementaría considerablemente, y por tanto también la rentabilidad privada.

En campo no solo se podría sembrar la planta de haba, sino también bajo el sistema de producción en invernadero, que, al contar con una estructura cubierta por plástico transparente, se obtiene un microclima favorable para cultivar plantas (Gil y Gómez, 2011).

Al evaluar los costos de producción de un invernadero rústico tipo túnel de superficie de 100 m² que cuenta con una estructura metálica cubierta de plástico de polietileno de 20 % de sombreado (720 galgas, 180 micras de espesor). Se obtuvo que, para esa superficie la densidad de plantas es de 7,200 plantas con un costo de producción de US \$ 376.59. El costo de producción generado incluyó insumos comerciales: semilla, composta, materiales diversos (en donde se incluyó la depreciación del invernadero, pala, carretilla, azadón, y otros) y factores internos (pago de labores y de servicios) (Cuadro 3.3A, Anexo). El precio de venta de la planta quedó en US \$ 0.17 (precio estimado para obtener una ganancia del 70 %), por lo que se obtuvo una ganancia privada superior

a lo obtenido con la venta de haba verde (cultivada en campo) a menudeo en ¼ ha (US \$ 629) y a mayoreo en ½ ha (US \$ 554.99) (Cuadro 3.8). La relación beneficio costo es de 3.33, igual que la relación beneficio costo evaluada para las plantas de haba crecidas en campo (Cuadro 3.8), por lo que, cualquier sistema de producción es conveniente para incrementar la rentabilidad del cultivo de *Vicia faba* L. Sin embargo, se debe considerar que bajo condiciones de campo se producen más compuestos funcionales, a diferencia de invernadero. Hoy en día no se produce haba verde bajo invernadero, así que la producción de planta podría ser atractiva bajo este sistema de producción intensivo.

Cuadro 3.8 Ganancias económicas de la producción de planta de haba en invernadero.

| Costos de producción (US \$) | Precio de venta de planta (US \$) | Relación Beneficio costo | Ganancia Privada (US \$) | Rentabilidad Privada (%) |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 376.59 | 3.47 | 0.17 | 878.71 | 233 |

Fuente: Elaboración propia con base en una superficie de 100 m², con información obtenida de los productores de haba, con costos actuales y de acuerdo a la información documentada de inversión de un invernadero por Hernández (2019).

Los resultados muestran que la producción de planta de haba en campo es más rentable a diferencia de la que se puede producir en invernadero. Esto se debe a que, los costos de producción se ven incrementados por el costo de instalación del invernadero y por la densidad de plantas que se podría obtener bajo esa superficie (100 m²). Sin embargo, un invernadero en comparación con la producción de un cultivo en campo (al aire libre) tiene ciertas ventajas como: brindar protección contra las inclemencias del tiempo (viento, lluvia, frío, exceso de calor), obtener mayor producción, se mejora la calidad del cultivo, además se puede obtener más de un ciclo de producción al año. También se tiene un mayor control de plagas y enfermedades, además se ahorra agua y fertilizantes (Gil y Gómez, 2011). Además, la agricultura protegida es vista como alternativa ante el cambio climático, ya que los cultivos experimentan una tendencia cada vez más marcada hacia la obtención de una producción anticipada o fuera de estación a lo que tradicionalmente se venía realizando en campo (Tornero *et al.*, 2019). Sin embargo, se requiere al principio de una inversión, de personal capacitado para mantener y poder trabajar el invernadero (Gil y Gómez, 2011). Lo cual muestra que la producción de planta de haba bajo invernadero tiene

una factibilidad técnica y económica baja para los productores de la región considerando sus condiciones socio-económicas; principalmente cuando se utiliza el cultivo hidropónico con soluciones nutritivas en un suelo inerte (el cual puede ser perlita, fibra de coco, lana de roca, tezontle), y cuando se tiene que mantener el ambiente controlado (temperatura, humedad) (Gil y Gómez, 2011).

En esta investigación al realizar la evaluación económica de la innovación tecnológica para el cultivo de *Vicia faba* L. en campo y en invernadero, se da a conocer la rentabilidad que se podría obtener si se realizara la siembra de plantas de haba bajo cualquier sistema de producción. Además de esta manera el agricultor conocerá el esquema que más se adapte a sus necesidades.

Factibilidad del uso de la innovación tecnológica

El mal de Parkinson, es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años. En México no se tienen cifras exactas de pacientes de Parkinson, pero el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía estima que hay cincuenta casos nuevos por cada cien mil habitantes al año (Gobierno de México, 2019). En el 2018 se tenía una población de 124.9 millones de habitantes (INEGI, 2019), por lo que, se puede estimar que en México prevalece aproximadamente 62, 450 enfermos con este padecimiento (0.05 % de la población en México).

A nivel mundial se estima que hay alrededor de cinco millones de personas de más de 50 años que padecen Parkinson (Gobierno de México, 2019), y también se considera que a nivel mundial el mercado de la L-DOPA es de 250 t año⁻¹, con un costo anual de \$ 101 mil millones de dólares (Patil *et al.*, 2013).

La mayor parte de la L-DOPA proviene de fuentes naturales o se sintetiza químicamente, pero también las fuentes biológicas se pueden usar de forma alternativa para su producción. L-DOPA de fuentes naturales reduce las complicaciones secundarias y también ayuda a retardar la progresión de la enfermedad. Así que la síntesis biológica de L-DOPA será el enfoque más prometedor para superar los efectos nocivos de las drogas químicas que provocan náuseas, vómitos, presión arterial baja e inquietud, somnolencia, el inicio repentino del sueño, alucinaciones y psicosis después de un uso prolongado (Patil *et al.*, 2013). Además, los fármacos tienen un costo elevado que ronda alrededor de los US \$64.03 como el medicamento Cloisone que contiene 100 tabletas con la combinación de 250 mg de L-DOPA y 25 mg de carbidopa. Difícilmente personas

enfermas de Parkinson de bajos recursos podrían adquirir el medicamento, por lo que, L-DOPA proveniente de plantas de haba podría ser una opción para proveer de este metabolito a un costo accesible.

Como factibilidad del uso de la innovación tecnológica se conoce que, en el mercado existen productos naturales a base de *Mucuna pruriens* (Cuadro 3.9), especie que ha sido utilizada como suministro de L-DOPA para los enfermos de Parkinson (Cassani *et al.*, 2016). Además los productos a base de esta especie indican que ayudan a mejorar la salud del cerebro y la función cognitiva, especialmente a las personas que tienen dificultades para coordinar actividades y con sus habilidades motoras. Al igual ayuda a aumentar los niveles de neurotransmisores monoamínicos, promoviendo así sentimientos de disfrute y motivación, y sirve como afrodisiaco, ya que incrementa los niveles de testosterona del cuerpo de forma natural, aumentando la libido y el deseo sexual. Estos productos son vendidos en capsulas o polvo y tienen un contenido aproximado por producto de 6, 300 – 12, 600 mg de L-DOPA, con un precio de venta que va de los US \$ 14.26 – US \$ 36.26, y con un costo aproximado de US \$ 2.15 gramo⁻¹ de L-DOPA (se consideran los costos de procesamiento, insumos, fabricación, envasado y etiquetado, etc.) (Cuadro 3.9).

En el Capítulo II, los rendimientos obtenidos de L-DOPA en plantas de 20 días después de la emergencia fueron de 100 – 130 mg planta⁻¹, independientemente de la condición de crecimiento (campo e invernadero) y de la variedad de haba analizada (Rojita, ICAMEX, José María, Matlatzintla). Por lo que, para obtener un producto como los de *Mucuna pruriens* de 6,300 mg de L-DOPA, se requerirían aproximadamente 63 plantas de haba, mientras que, para un producto de 10,800 mg de L-DOPA, se requerirán aproximadamente de 108 plantas de haba. Así que los productores de haba podrían incurrir en este mercado de producción de plantas de haba para la obtención de L-DOPA o compuestos bioactivos. Además de involucrarse en el procesamiento que conllevaría un producto similar como los de *Mucuna pruriens*.

L-DOPA en *Mucuna pruriens* se puede encontrar en las semillas mayoritariamente de 4.93 – 5.39 %, mientras que en los tejidos de la planta los contenidos son bajos de 0.12 – 0.35 % (Pugalenthi y Vadivel, 2007). En el caso de *Vicia faba* L. los contenidos mayoritarios los encontramos en los tejidos de la planta joven, como en las raíces de planta de 3 a 9 días 9 % (Oviedo-Silva *et al.*, 2018), en el eje embrionario al sexto día de la germinación 7.46 – 8.43 % y en la planta de haba

de 20 días después de emergencia 9.21 %, a diferencia de los contenidos en las semillas de haba 0 – 0.202 % (Kirakosyan *et al.*, 2014). Además, para la obtención de semillas de *Mucuna pruriens* tarda un periodo de entre ocho y nueve meses (Pool *et al.*, 1998), mientras que la planta de haba se obtiene en un mes. Así que la planta de *Vicia faba* L. podría ser otra alternativa de fuente natural para la obtención de L-DOPA, la cual es más viable por su contenido y por la rapidez para su obtención.

Cuadro 3.9 Productos a base de *Mucuna pruriens* como fuente natural de L-DOPA.

| Producto | Cantidad L-DOPA (%) | L-DOPA por producto (mg) | Contenido de L-DOPA por capsula (mg) | Precio del producto (US \$) | Precio aprox. por gramo (US \$) | Ref. |
|----------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------|
| Capsulas | 15 | 6, 300 | 52.50 | 14.42 | 2.28 | 1 |
| Capsulas | 20 | 12, 600 | >140 | 36.29 | 2.88 | 2 |
| Polvo | 100 | 10, 000 | - | 21.97 | 2.19 | 3 |
| Capsulas | 40 | 10, 800 | 180 | 14.30 | 1.32 | 4 |

Fuente: Elaboración propia con información recabada de productos naturales a base de *Mucuna pruriens* (agosto 2020).

1. <https://mx.pipingrock.com/herbal-supplements-all/dopa-mucuna-pruriens-standardized-350-mg-120-capsules-6121?bvstate=pg%3A2%2Fct%3Ar&umrids=21987>
2. <https://keterwellness.com/collections/frontpage/products/mucuna-l-dopa-20>
3. <https://www.nutrivitashop.com/l-dopa-100-pure-levodopa-mucuna-pruriens-dopamine/>
4. <https://www.healthessentialsdirect.co.uk/products/buy-mucuna-pruriens-extract-capsules>

Hay evidencias del efecto benéfico de L-DOPA proveniente de plantas de haba en pacientes con Parkinson, pero aún se necesita realizar estudios de la biofuncionalidad que tienen los compuestos bioactivos (CFT, L-DOPA, FT, DAD) de la planta de haba que confirme su efecto en la salud, para que esta innovación tecnológica pueda ser mayormente aceptada y fiablemente aplicada.

3.4 Conclusiones

La innovación tecnológica del cultivo de planta de haba, es una alternativa que puede contribuir a mejorar los ingresos de las familias productoras.

Bajo los sistemas de producción, campo e invernadero, la evaluación económica de la producción de planta de haba de veinte días después de la emergencia, evidencio ser más rentable con un costo beneficio de 3.33, a diferencia de la producción a menudeo de haba verde (1.5, 2.5 y 2.15 en ¼, ½ y 1 ha respectivamente) o a mayoreo (0.96, 1.38 y 1.36 en ¼, ½ y 1 ha respectivamente). La producción de planta de haba en campo, es más rentable que la producida en invernadero, pero la agricultura protegida presenta ventajas que en campo no las tiene.

La investigación realizada en haba mostró cómo aprovechar e implementar innovaciones tecnológicas para el uso de los recursos fitogenéticos en beneficio de la sociedad, y da pauta a nuevas perspectivas de investigación, a un estudio de mercado y a un estudio de valoración económica para estimar la disposición a pagar del consumidor con un producto con estas características, a fin de evaluar la factibilidad que podría tener la aplicación de la innovación tecnológica en el cultivo de haba.

3.5 Literatura Citada

- Amaro-Rosales M. y Gortari-Rabiela R. 2016. Innovación inclusiva en el sector agrícola mexicano: los productores de café en Veracruz. *Economía Informa*. 400, 86-104.
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2001. Claridades Agropecuarias Órgano Desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2116-102. México D.F.
- Ayala-Garay A. V., Schwentesius-Rindermann R., De la O-Olán M., Preciado-Rangel P., Almaguer-Vargas G., Rivas-Valencia P. 2013. Análisis de rentabilidad de la producción de maíz en la región de Tulancingo, Hidalgo, México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*. 10: 381-395.
- Cassani E., R. Cilia, J. Laguna, M. Barichella, M. Contin, E. Cereda, Ioannis U. I., F. Sparvoli, A. Akpalu, K. Ofosu B, M. T. Scarpa, G. Pezzoli. 2016. *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. *Journal of the Neurological Sciences*. 365: 175–180.
- Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria (CEDRSSA). 2014. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014. INEGI – SAGARPA. Disponible en: <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/51> Consultada el 5 de abril de 2020.

- Charpantier F., E. Mora. 1999. Aplicación de la Metodología Matriz de Análisis de Política (MAP): el Caso de la Cebolla amarilla en Costa Rica. En XI Congreso Nacional Agronómico. pp. 471-481.
- Espejel-García A., Barrera-Rodríguez A., Cuevas-Reyes V. 2016. Dinámica de la innovación y ganancias económicas de la producción de leche en el Valle del Mezquital, Hidalgo. *Nova Scientia*. 8: 391 – 408.
- Etemadi F., Hashemi M., Mangan F., Weis S. 2015. *Faba beans; Growers guide in New England*. University of Massachusetts Amherst. Disponible en: http://ag.umass.edu/sites/ag.umass.edu/files/research-reports/faba_bean_guide_2.pdf
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141.
- Etemadi F., Hashemi M., Barker A. V., Reza Z. O., Liu X. 2019. Agronomy, Nutritional Value, and Medicinal Application of Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Horticultural Plant Journal*. 5 (4): 170-182. Fideicomiso Institucional en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Frijol. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf. (Consultado el 30 de marzo de 2020).
- Franco S. M. A., J. A. Leos R., J. M. Salas G., M. Acosta R., A. García M. 2018. Análisis de costos y competitividad en la producción de aguacate en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9: 391 - 404.
- Fuentes-Herrera P. B. 2016. Valor nutritivo y nutraceuticos en colectas de haba (*Vicia faba* L.) pertenecientes a los principales estados productores de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *campus* Puebla (COLPOS). 182 p.
- Fuentes-Herrera P. B., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, J. I. Olvera-Hernández, Ma. L. Luna-Guevara. 2020. Percepción del consumo y uso de haba: aporte nutricional en Ciudad Serdán, Puebla, México. *Revista Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 17:1-16.
- Gaucín D. 2019. “El mercado mundial y nacional del frijol”, *El Economista*, 28 de marzo Disponible en: <https://www.economista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-frijol-20190328-0088.html> (Consultada el 29 de marzo de 2020).
- Gobierno de México. 2019. Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es> (Consultada el 6 de octubre de 2020).
- Hernández H. B. N. 2019. Productividad y rentabilidad de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) cultivado hidropónicamente bajo condiciones de agricultura protegida. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *campus* Puebla (COLPOS). 110 p.
- Herrera T. F. 2006. Innovaciones tecnológicas en la agricultura empresarial mexicana. Una aproximación teórica. *Revista Gaceta Laboral*. 12: 91–117.

- Hu J., S. J. Kwon, J. J. Park, E. Landry, D. S. Mattinson, D. R. Gang. 2015. LC-MS determination of L-DOPA concentration in the leaf and flower tissues of six faba bean (*Vicia faba* L.) lines with common and rare flower colors. *Functional Foods in Health and Disease*. 5(7): 243-250.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2019. Mujeres y hombres en México 2019. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/estructura/> (Consultada el 6 de octubre de 2020).
- Jiménez J. R. A., Espinosa O. V., Soler F. D. M. 2013. El costo de oportunidad de la mano de obra familiar en la economía de la producción lechera de Michoacán, México. *Revista de Investigacion Agraria y Ambiental*. 5: 47-56.
- Jordán-Aguilar B., R. Díaz-Ruíz, I. Ocampo-Fletes, C. Jacinto-Hernández, J. A. S. Escalante-Estrada, E. Pérez-Ramírez. 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*. 29: 2-23.
- Kirakosyan A., P. B. Kaufman, J. A. Duke, S. Warber, S. Bolling. 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). *Evidence-Based Integrative Medicine* 1:131-135.
- Lara, R. F. 1998. "Actores y procesos en la innovación tecnológica". En: Lara, R. F. (Coordinador). *Tecnología. Conceptos, problemas y perspectivas*. Siglo Veintiuno Editores. UNAM. México.
- La innovación tecnológica: definiciones y elementos de base. 1996. *Redes*, 3:131-175.
- Mankiw N. G. 2012. *Principios de economía* 6ª ed. México: CENGAGE Learning.
- Maphosa Y., V. A. Jideani. 2017. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. Capítulo 6 The Role of Legumes in Human Nutrition. P 103-121.
- Gil M. E., Gómez E. J. M. 2011. Cultivos Bajo Cubierta en el Sureste de España. *Papeles de Geografía*. (53-54): 155-170.
- Monke, E. A., S. R. Pearson. 1989. *The Policy Analysis Matrix for Agricultural Development*. Cornell University Press. Ithaca and London. 220 p.
- Multari S., D. Stewart, W. R. Russell. 2015. Potential of faba bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 511 -522.
- Olmedilla Alonso B., R. Farré R., C. Asensio V., M. Martín P. 2010. Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*. 14:72-76.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2020. México en una mirada. La agricultura y el desarrollo rural en México. Recuperado de: <http://www.fao.org/mexico/fao-en-mexico/mexico-en-una-mirada/es/> (Consultado el 26 de marzo de 2020).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT). 2019. Base de datos estadísticos. Comparar Datos. Balances de alimentarios. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#compare> (Consultado el 30 de marzo de 2020).

- Orozco C. N., D. de J. Pérez L., A. González H., O. Franco M., F. Gutiérrez R., M. Rubí A., Á. Castañeda V., A. Balbuena M. 2013. Identificación de poblaciones sobresalientes de haba colectadas en el Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:921-932.
- Ortiz L. M., A. D. Alvarado, B. E. Herrera C., Ma. de L. Árevalo G., A. I. Barrera R. 2019. Efecto de dos métodos de secado en los compuestos fenólicos totales, L-DOPA y la actividad antioxidante de *Vicia faba* L. *Nova Scientia*. 11: 198 – 219.
- Oviedo-Silva C. A., Elso-Freudenberg M., Aranda-Bustos M. 2018. L-DOPA Trends in Different Tissues at Early Stages of *Vicia faba* Growth: Effect of Tyrosine Treatment. *Applied Sciences*. 8, 2431.
- Patil S. A., O. A. Apine, S. N. Surwase, J. P. Jadhav. 2013. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. *Advances in Parkinson Diseases*. 2: 81-87.
- Pérez L. D. de J., González H. A., Rubí A. M., Franco M. O, Franco M. J. R. P., Padilla L. A. 2015. Análisis de 35 cultivares de haba por su producción de vaina verde y otros componentes del rendimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6 (7): 1601-161.
- Pichardo-Riego J. C., Escalante-Estrada J. A. S., Díaz-Ruiz R., Quevedo-Nolasco A., Volke-Haller V., Morales-Rosales E. J. 2013. Rendimiento y eficiencia en el uso de agua de cultivares de haba (*Vicia faba* L.) para doble propósito. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 19 (1): 71-84.
- Piping Rock Health Products. 2020. Producto: DOPA Mucuna Pruriens. Disponible en: <https://mx.pipingrock.com/herbal-supplements-all/dopa-mucuna-pruriens-standardized-350-mg-120-capsules-6121?bvstate=pg%3A2%2Fct%3Ar&umrids=21987> (Consultado el 30 de marzo de 2020).
- Pires T.C.S.P., M. I. Dias, L. Barros, R. C. Calhelha, M. J. Alves, M. B. P.P. oliveira, C. Santos-Buelga, I. C.F.R. Ferreira. 2018. Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*. 105: 580 – 588.
- Prabhu D. S., D. Rajeswari V. 2018. Nutritional and Biological properties of *Vicia faba* L.: A perspective review. *International Food Research Journal* 25: 1332 – 1340.
- Pool N. L., N. S. León M., C. González S. P. Figueroa F. 1998. Frijol terciopelo, cultivo de cobertura en la agricultura chol del valle del Tulija, Chiapas, Mexico.16:359-369.
- Pugalenthi M., V. Vadivel. 2007. L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine): A Non-Protein Toxic Amino Acid in Mucuna pruriens Seeds. *Global Science Books*. 1: 322 – 343.
- Rojas-Tiempo J., Díaz-Ruiz R., Álvarez-Gaxiola F., Ocampo-Mendoza J. y Escalante-Estrada A. 2012. Tecnología de producción de haba y características socioeconómicas de productores en Puebla y Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(1): 35-49.
- Samuelson P. A., W. D. Nordhaus. 2010. Economía con aplicaciones en américa latina 19ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/ . (Consultado el 26 de marzo de 2020).

- Tornero C. M. A., Sandoval C. E., Hernández H. B. N. 2019. La Agricultura Protegida como Alternativa de Producción ante los Efectos del Cambio Climático. En: Bock S. Y., Para I. F., Tornero C. M. A., Estrella C. N., Díaz R. R y Hernández S. J. H. Coopiladores. *50 años de Experiencias en la Operación, Investigación y Capacitación para la Seguridad Alimentaria y el Desarrollo Rural (1967-2018)*. Puebla: Colegio de Postgraduados.
- Vered Y., J. M. Rabey, D. Palevitch, I. Grosskopf, A. Harsat, A. Yanowski, H. Shabtai, E. Graff. 1994. Bioavailability of Levodopa after Consumption of *Vicia faba* Seedlings by Parkinsonian Patients and Control Subjects. *Clinical Neuropharmacology*. 17: 138-146.

CAPITULO IV: L-DOPA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PLANTAS DE *Vicia faba* L.: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO*

Resumen

Vicia faba L. contiene compuestos bioactivos por los cuales podría ser considerada una planta medicinal. De esta especie comúnmente solo se utiliza el fruto para consumo humano o animal. Sin embargo, la planta de este cultivo es una fuente rica de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y de otros compuestos con actividad biológica. L-DOPA es un compuesto que se suministra de fuentes sintéticas a los enfermos de Parkinson para restaurar las concentraciones de dopamina en el cerebro. El trabajo tuvo como objetivos: determinar el contenido y rendimiento de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y L-DOPA en plantas de cuatro variedades de haba mexicanas; además de analizar el perfil de flavonoides, la actividad antioxidante y actividad anti-inflamatoria *in vitro* de los extractos de estas variedades. En condiciones de campo, las variedades de haba se sembraron en alta densidad y las plantas se cosecharon a los 20 días después de su emergencia, posteriormente se secaron en estufa a 38 °C y después se molieron. El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-DOPA, y las actividades antioxidante (DPPH) y anti-inflamatoria (AANTI) se determinaron por espectrofotometría UV-visible. Además, la concentración de L-DOPA, rutina e isoorientina se cuantificaron por HPLC. La variedad Matlatzintla presentó los contenidos más altos de CFT (135.62 mg EAG g⁻¹ MS), FT (118.58 mg EQ g⁻¹ MS) e isoorientinas (46.07 g Kg⁻¹ MS) y la variedad Rojita de L-DOPA (654.50 g Kg⁻¹ MS) y rutina (7.12 g Kg⁻¹ MS). La planta de haba tuvo en promedio una acumulación de 512.04 g kg⁻¹ MS de L-DOPA, 5.70 g Kg⁻¹ MS de rutina y 41.39 g kg⁻¹ MS de isoorientinas. Por unidad de área, las plantas de la variedad José María tuvieron el rendimiento mayor de CFT (9.30 g m⁻²), FT (8.08 g m⁻²) y L-DOPA (5.64 g m⁻²), y por planta el rendimiento mayor se encontró en la variedad Rojita: CFT (0.25 g planta⁻¹), FT (0.21 g planta⁻¹) y L-DOPA (0.17 g planta⁻¹). Estos rendimientos en haba son importantes para considerar una producción masiva de plantas para utilizarse como productos naturales para el tratamiento o prevención de enfermedades crónicas. La variedad Rojita también destacó por presentar una mayor actividad antioxidante (DPPH CI₅₀ = 87.68 µg mL⁻¹) y anti-inflamatoria (CI₅₀ = 74.40 mg mL⁻¹), que se atribuyen a L-DOPA y a rutina e isoorientina, respectivamente.

Palabras clave: Campo, enfermedad de Parkinson, flavonoides, isoorientina, rendimiento, rutina.

Abstract

Vicia faba L. contains bioactive compounds by which could be considered a medicinal plant. In this species, only the fruit is commonly used for human or animal consumption. However, the broad bean plant is a rich source of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and other compounds with biological activity. L-DOPA is a compound that is supplied from synthetic sources to Parkinson's patients to restore dopamine levels in the brain. The study aimed to: determine the content and yield of total phenolic compounds, total flavonoids, L-DOPA in four varieties plants Mexican bean; in addition to analyzing the flavonoid profile, antioxidant activity and anti-inflammatory activity *in vitro* of the extracts of these varieties. In field conditions, the broad bean varieties were sown in high density and the plants were harvested 20 days after their emergence, later they were dried in an oven at 38 °C and then ground. The content of total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TF), L-DOPA, and antioxidant (DPPH) and anti-inflammatory (AANTI) activities were determined by UV-visible spectrophotometry. In addition, the concentration of L-DOPA, rutin, and isoorientin were quantified by HPLC. The Matlatzintla variety presented the highest contents of TPC (135.62 mg EAG g⁻¹ MS), TF (118.58 mg EQ g⁻¹ MS) and isoorientins (46.07 g Kg⁻¹ MS) and the Rojita variety of L-DOPA (654.50 g Kg⁻¹ DM) and rutin (7.12 g Kg⁻¹ DM). The broad bean plant presented an average accumulation of 512.04 g kg⁻¹ DM of L-DOPA, 5.70 g Kg⁻¹ DM of routine and 41.39 g kg⁻¹ DM of isoorientins. Per unit area, the José María variety plants had the highest yield of TPC (9.30 g m⁻²), FT (8.08 g m⁻²) and L-DOPA (5.64 g m⁻²). The highest yield per plant was found in the Rojita variety: TPC (0.25 g plant⁻¹), TF (0.21 g plant⁻¹) and L-DOPA (0.17 g plant⁻¹). These bean yields are important to consider a mass production of plants and can be used as natural products for the treatment or prevention of chronic diseases. These broad bean yields are important to consider a massive production of plants to be used as natural products for the treatment or prevention of chronic diseases. The Rojita variety also stood out for presenting a higher antioxidant activity (DPPH IC₅₀ = 87.68 µg mL⁻¹) and anti-inflammatory activity (IC₅₀ = 74.40 mg mL⁻¹), which are attributed to L-DOPA, routine and isoorientin, respectively

Keywords: Field, flavonoids, isoorientin, Parkinson's disease, performance, routine.

4.1 Introducción

Las plantas medicinales tienen un papel importante en la salud. Su uso está aumentando, principalmente porque en comparación con los medicamentos sintéticos son económicos, asequibles y se evitan efectos secundarios que la medicina convencional provoca. Además, son accesibles para personas de escasos recursos (Akinyemi *et al.*, 2018). Sofowora *et al.* (2013) define a una planta medicinal como “...cualquier planta que, en uno o más de sus órganos, contenga sustancias que puedan ser utilizadas con fines terapéuticos o que sean precursoras para la síntesis de fármacos útiles”.

Vicia faba L. es una leguminosa de la cual solo se utiliza el fruto para consumo humano o animal, y se ha reportado ser una fuente rica de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), ya que en distintas partes u órganos de la planta acumula una gran cantidad de este metabolito (Etemadi *et al.*, 2018a, 2018b). Las plántulas son las que acumulan una alta concentración de L-DOPA a diferencia de sus otros tejidos (Etemadi *et al.*, 2018b), incluyendo al fruto. Por ejemplo, las plántulas frescas pueden llegar a tener contenidos de este metabolito de hasta 20 veces más en comparación con el fruto de haba (Vered *et al.*, 1994).

L-DOPA es un compuesto utilizado por los enfermos de Parkinson para restaurar las concentraciones de dopamina en el cerebro. La enfermedad está relacionada con la reducción de dopamina; alteración que es provocada por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, provocando una menor producción del neurotransmisor. Lo que induce a los principales síntomas de la enfermedad: bradicinesia, rigidez, temblor y alteraciones posturales y de la marcha (Baroni y Zuliana, 2015). El suministro de L-DOPA a los enfermos de Parkinson, es a través de medicamentos sintéticos. Sin embargo, se ha comprobado que el consumo de habas (250 g de habas cocidas) en pacientes tiene un efecto similar al del fármaco, ya que mostró un mejoramiento significativo en sus características motoras, similares cuando se consume levodopa (125 mg) más carbidopa (12.5 mg) de manera sintética (Rabey *et al.*, 1992). También se ha evaluado la biodisponibilidad de L-DOPA en el plasma sanguíneo después del consumo de plántulas frescas de haba (40 g, aproximadamente 120 – 130 mg de L-DOPA). Lo que generó un aumento de la concentración de L-DOPA y una mejoría en las características motoras del paciente similares a cuando se administra la droga (Vered *et al.*, 1994).

Por su efecto benéfico en los enfermos de Parkinson, *V. faba* podría ser considerada una planta medicinal. La medicina tradicional vuelve a tomar dirección, pero ahora, junto con el conocimiento científico si la ciencia se enfocara en su búsqueda, los productos naturales podrían abordar los procesos patológicos subyacentes asociados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Essa *et al.*, 2014). *V. faba* al ser una fuente natural de L-DOPA podría ser propuesta para su producción (Patil *et al.*, 2013). La planta de esta especie, a los 75 días después de la siembra, tiene rendimientos importantes de L-DOPA que pueden rondar hasta los 55.2 kg ha⁻¹ MS, mientras que en las semillas los rendimientos rondan entre 3.4 a 38 kg ha⁻¹ (Etemadi *et al.*, 2018a) y de 4 a 46 kg ha⁻¹ (Etemadi *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que además de la L-DOPA, otros fitoquímicos derivados de otras especies de plantas han demostrado disminuir o revertir la degeneración neuronal observada en la enfermedad de Parkinson. Debido a que estos compuestos pueden reducir la producción de especies reactivas de oxígeno, promueve el desarrollo de agentes contra la neuroinflamación, la producción de dopamina, entre otras funciones que tienen en la prevención y mitigación de algunos de los signos y síntomas de la enfermedad (Essa *et al.*, 2014). También, Ho *et al.* (2012) recabaron información sobre compuestos fenólicos, polisacáridos y oligosacáridos que tienen un efecto potencial como neuroprotectores; por su acción como antioxidante, antiinflamatorio y como agente inmunomodulador, para prevenir o retrasar la progresión de enfermedades asociadas con la edad como son el Alzheimer, Parkinson y degeneración macular. Sin embargo, se requiere mayor investigación para conocer la viabilidad y la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica de estos compuestos.

Además de L-DOPA, en la planta de *V. faba* se pueden encontrar compuestos fenólicos (Rhandir y Shetty, 2003; Ortiz *et al.*, 2019), isoflavonas como daidzeína y genisteína en tallo (Kaufman *et al.*, 1997; Fuentes-Herrera *et al.*, 2020) y en plántulas (Kirakosyan *et al.*, 2004), y glucósidos de Kaempferol en germinados (Okumura *et al.*, 2016). Sin embargo, aún se requieren de estudios en donde se identifiquen que otros metabolitos con propiedades bioactivas se podrían obtener del tejido de la planta de haba para investigar el efecto sinérgico que pudiera tener y proponerla como una planta medicinal con diferentes beneficios para la población.

Hay evidencia de que la testa de la semilla de haba presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria (Boudjou *et al.*, 2013). Mientras que en el tejido de la planta de haba solo se ha

reportado que tiene actividad antioxidante (Ortiz *et al.*, 2019), pero se desconoce del efecto antiinflamatorio que podría proporcionar.

Bajo la hipótesis de que la planta de *V. faba* tiene contenidos importantes de compuestos bioactivos y que presenta actividad antioxidante y anti-inflamatoria, demuestra que puede ser aprovechada por el ser humano como suplemento y/o producto funcional para mejorar la salud. El estudio tuvo dos objetivos: el primero fue determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y L-DOPA y obtener su rendimiento en plantas de cuatro variedades de haba mexicanas; el segundo fue analizar en los extractos de las plantas su perfil de flavonoides, la actividad antioxidante y actividad anti-inflamatoria *in vitro*.

4.2 Materiales y métodos

Siembra del material vegetal

Se utilizaron las variedades de habas mexicanas Rojita, ICAMEX V-31, José María y Matlatzintla de diferente precocidad, donadas por el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). La siembra se realizó en *campo* en la comunidad de San Agustín Calvario de San Pedro Cholula, Puebla (19° 03' 03'' latitud norte, 98° 20' 37'' longitud oeste) el día 11 de septiembre del 2019. Las semillas de las variedades se sembraron en almacigo, en parcelas de 4,800 cm² (80 x 60 cm), con dos semillas por mata aproximadamente a una profundidad de 5 cm, a una distancia de 20 cm entre plantas. La siembra se realizó a una mayor densidad de plantas de como suele sembrarse comúnmente, a una distancia de 85 cm entre surcos y de 70 cm entre matas. Cada parcela fue una repetición y se establecieron cuatro repeticiones por variedad (Figura 4.1).

Identificación y recolección del material vegetal

En campo se visitó el terreno de cultivo todos los días entre las 8:00 y 10:00 am, y cuando las plantas comenzaron a emerger se identificó el día de la emergencia con estambres de colores, así como se realizó en el Capítulo I y II. De esta manera se realizó el monitoreo del desarrollo de las plantas de las cuatro variedades de habas mexicanas hasta los 20 días después de la emergencia (DDE), inmediatamente las plantas se cosecharon (\pm 1 día). En la Figura 4.1 A del Anexo 4A se

presentan las imágenes del desarrollo de la planta de la variedad Matlatzintla, del primer día de la emergencia hasta el día veinte de desarrollo.



Figura 4.1 Siembra de *Vicia faba* L. a mayor densidad; a) productor de haba cuadrando el terreno, b) vista frontal del encuadre del suelo a una distancia de 20 cm entre matas (2 semillas por mata), c) vista lateral de las parcelas, d) vista frontal de las parcelas.

Procesamiento del material vegetal

El material vegetal que germinó inmediatamente se clasificó como de germinación violenta, mientras que el material que tardó en germinar se clasificó como de germinación lenta. Una vez que el material vegetal fue cosechado (planta de 20 DDE sin raíces), se contó el número de folíolos completos a cada planta, posteriormente se hicieron grupos de tres plantas de la misma variedad y parcela, se trocearon y colocaron en una bolsa de papel y se registró su peso en una balanza analítica. Inmediatamente se secaron en estufa de convección forzada (SHEL LAB, 1370FX,

E.U.A.) a 38 °C durante 24 h aproximadamente hasta que el porcentaje de humedad del material vegetal, determinado en termobalanza (OHAUS, MB 45), estuviera entre 7 - 10 %. Las plantas secas se trituraron en un triturador de granos de café (KRUPS, GX4100, E.U.A.), y se tamizó a 500 μm (tamaño de partícula). El polvo se almacenó en bolsas de papel celofán en refrigeración (4 ± 1 °C) para su posterior uso en las diferentes determinaciones.

De cada variedad de haba se tuvo el registró de la cantidad de plantas por parcela, y se evaluó el rendimiento de los compuestos bioactivos analizados en el material vegetal por planta, por kilogramo y por metro cuadrado.

Variables agroambientales

En el campo donde se estableció el experimento se colocó un datalogger (HOBO, U12-012), durante el tiempo de crecimiento de las plantas para registrar las variables agroambientales temperatura (°C), humedad relativa (%) e intensidad luminosa (lum sqf^{-1}), que se transformó en densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 4.2). En la Figura 4.3 se observan los valores medios de las variables agroambientales en tres intervalos de tiempo en el día (7:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm) durante todo el desarrollo de las plantas. En el Cuadro 4.1 se muestran los valores medios de cada variable ambiental en tres intervalos de tiempo en el día.

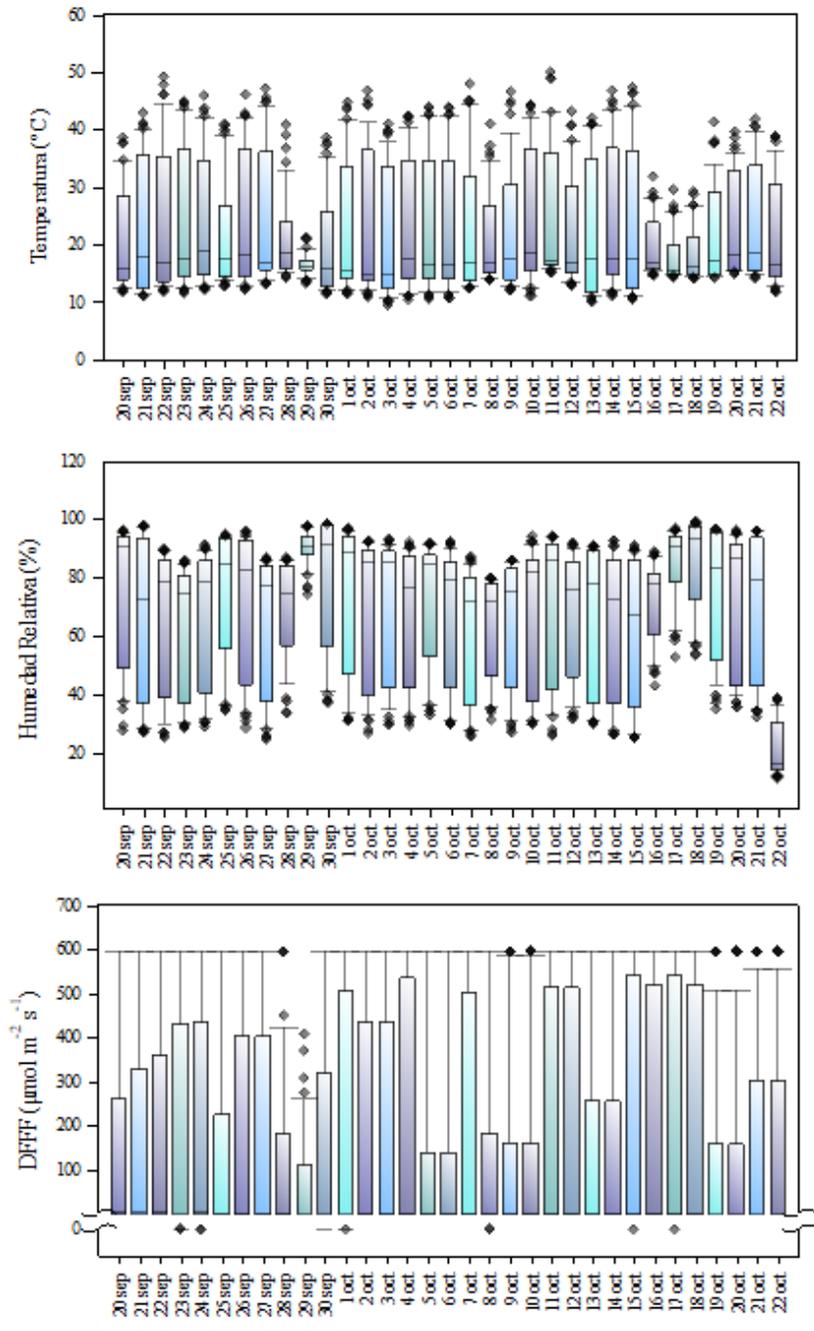


Figura 4.2 Variables agroambientales registradas en campo durante el desarrollo de plantas de *Vicia faba* L a los 20 días después de la emergencia. Cada caja representa 48 datos por día. El primer y tercer cuartil representa la mayor distribución de los valores, mientras que el segundo cuartil indica la mediana de los valores. Los brazos representan los valores mínimos y máximos y los puntos externos los datos atípicos. Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF).

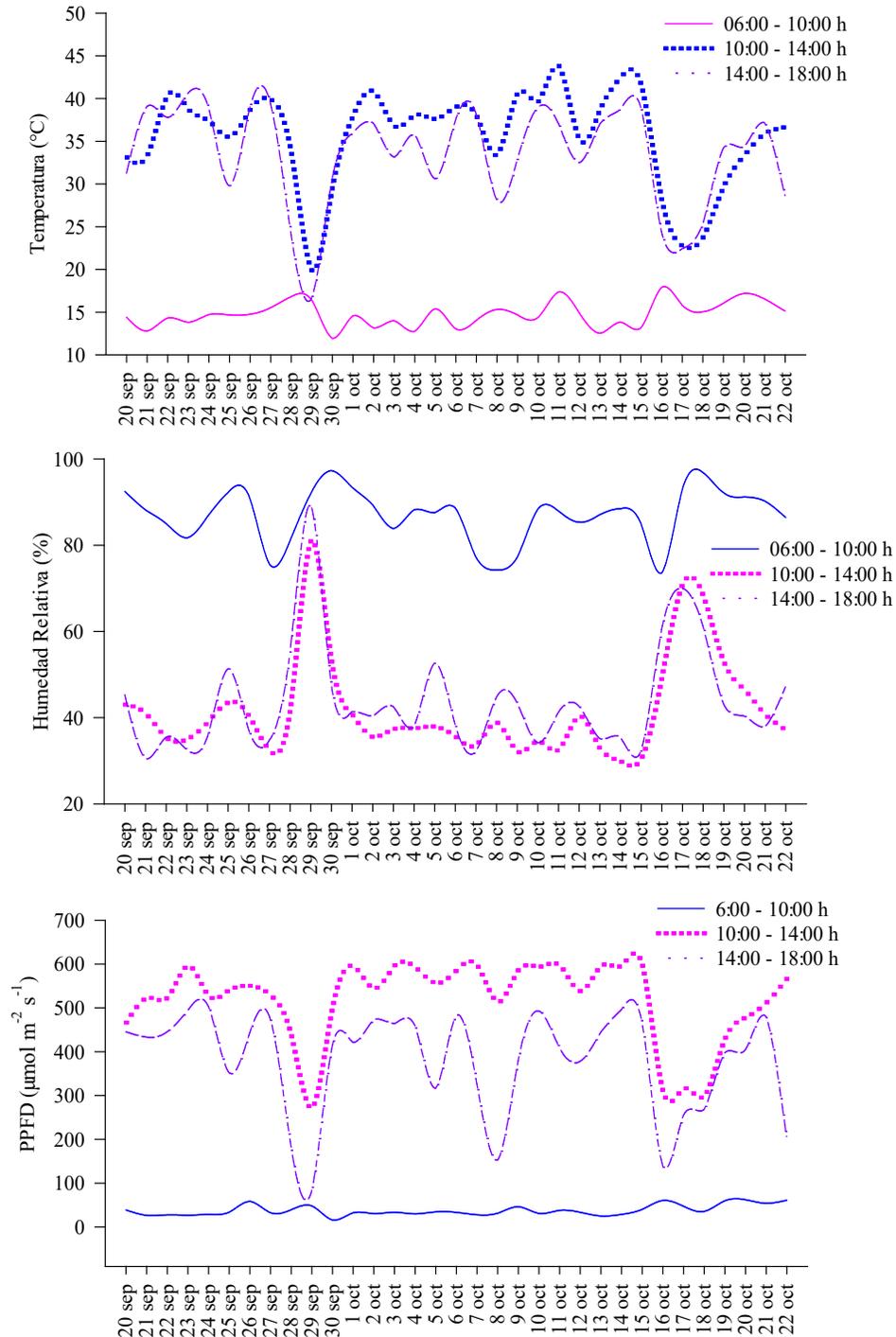


Figura 4.3 Medias de las variables agroambientales registradas en campo en tres intervalos de tiempo en el día (7:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm), durante el desarrollo de las plantas de *Vicia faba* L. de 20 días después de la emergencia. Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF).

Cuadro 4.1 Medias generales de las variables agroambientales en los intervalos de tiempo de 6:00 a 10:00 am, 11:00 am a 14:00 pm y 15:00 a 18:00 pm en el día, durante el crecimiento de las plantas de *Vicia faba* L.

| | Hora día | | |
|---|---------------|---------------|---------------|
| | 07:00 a 10:00 | 11:00 a 14:00 | 15:00 a 18:00 |
| T (°C) | 20.32 | 43.24 | 39.21 |
| HR (%) | 86.39 | 41.86 | 43.95 |
| DFFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 43.47 | 517.22 | 381.63 |

T: temperatura, HR: humedad relativa, DFFF: densidad de flujo de fotones fotosintéticos.

Determinación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

Extracción. Para la extracción de los compuestos fenólicos se pesaron 10 mg de polvo de planta de haba y se diluyeron con 10 mL de 100 % metanol (J.T. Baker, 9070-03). La mezcla se homogenizó y se llevó a un baño ultrasónico durante 30 min (Auto Sd Science, AS5150B). Después se centrifugó a 4,600 *g* (7000 rpm, rotor de 8.39 cm de radio) a 4°C (2 min) (HERMLE, Z326K), se extrajo el sobrenadante y el extracto se depositó en tubos eppendorf para ser almacenados a -20 °C previo a su análisis.

Análisis. Las determinaciones de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, se realizaron de acuerdo a las metodologías utilizadas en los Capítulos I y II.

Determinación de L-DOPA por espectrofotometría UV-Visible en microplaca

Extracción. La extracción de L-DOPA se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Polanowska *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Se pesaron 40 mg de la muestra y se colocó en un tubo falcón de plástico de 15 mL, posteriormente se agregó 7 mL de la solución extractora 0.2 % ác. acético (v/v). Se sónico durante 20 s con el equipo Ultra-Turrax a 21 500 rpm (IKA, T25 basic S1). Después los tubos se colocaron inclinados en un orbital (Daigger, OR100) durante 20 min, pasados 10 min los tubos se giraron y se deja transcurrir el tiempo restante. La mezcla se filtró al vacío en un matraz kitasato con papel filtro No. 42 (Whatman, 1442-055). El extracto se colocó en eppendorf y se conservó en refrigeración a (4 °C), seguidamente fue analizado debido a que el extracto solo es estable por 24 h sin que se empieza a oxidar, por lo que, los análisis se realizaron el mismo día de la extracción o al día siguiente (Figura 4.4). Aunque Polanowska *et al.* (2019) desarrollaron un método simple y robusto para la extracción de L-DOPA proveniente de

semillas de haba, en este estudio se probó la eficacia del método con los tejidos de la planta de haba. Así que previo a la estandarización del método de extracción se realizaron algunas de las evaluaciones que los autores realizaron: concentración de la solución extractora al 0.1 (pH 4.80) 0.2 (pH 4.66) y 0.3 % (4.36 pH) y el incremento de la concentración de L-DOPA con una doble extracción.

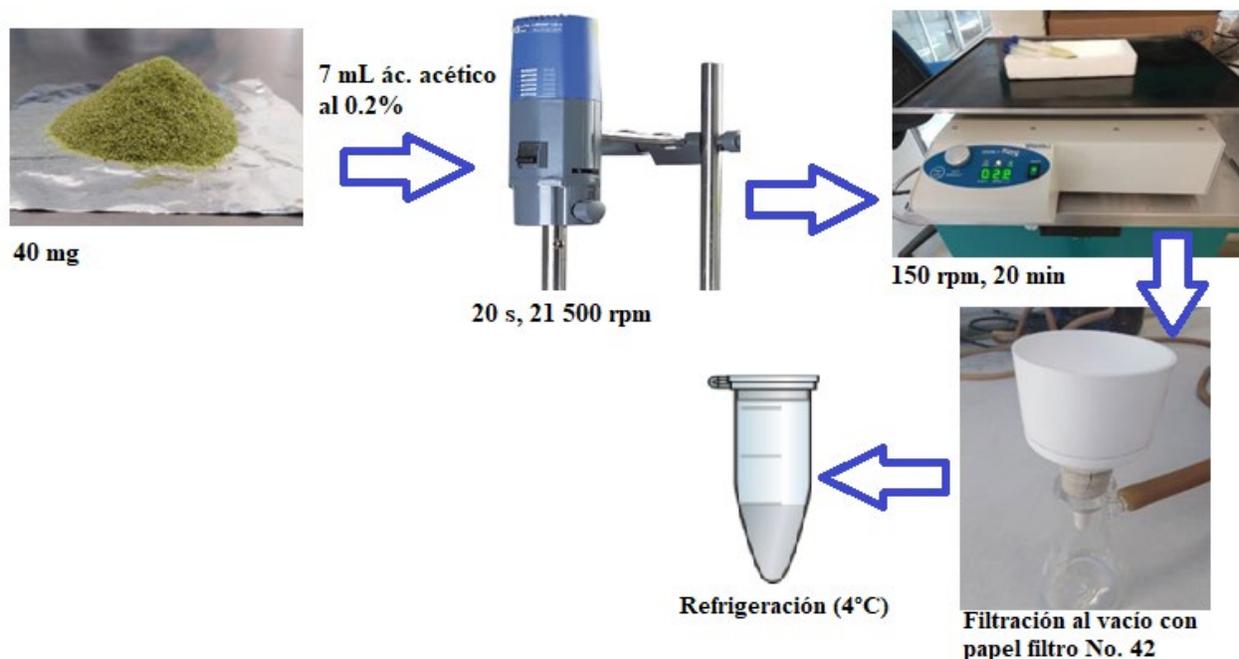


Figura 4.4 Procedimiento de la extracción de L-DOPA en *Vicia faba* L.

Análisis. Se realizó con base en la metodología propuesta por Rahmani-Nezhad *et al.* (2018). La metodología se adaptó para espectrofotometría en microplaca. En una microplaca UV de fondo plano se adicionaron 10 μL del extracto (5.7 mg mL^{-1}) o estándar, se agregaron 20 μL de nitrito de sodio (NaNO_2) al 3 % (p/v) y 10 μL de ácido clorhídrico (HCl) a una concentración de 1 mol L^{-1} , la mezcla se agitó y se dejó reposar por 5 min, se observa cómo la mezcla se torna amarilla. Pasado el tiempo se agregó 30 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 mol L^{-1} y se dejó reposar por 5 min, la mezcla toma una coloración rojiza. Transcurrido el tiempo se agregaron 180 μL de agua destilada y se leyó a 253 nm. Para definir la longitud de onda a la que el ensayo registra la máxima absorbancia, se realizó un barrido al extracto en el rango de 200 – 600 nm contra un blanco

(conteniendo los mismos reactivos del ensayo, excepto el analito), y se registró una λ_{\max} a los 253 nm. Se utilizó el estándar de L-DOPA (Sigma, No. Cat. PHR1271) disuelto en una solución de 0.2 % de ácido acético quedando una concentración de $84 \mu\text{g mL}^{-1}$ para elaborar una curva de calibración de $3.36 - 33.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4.5).

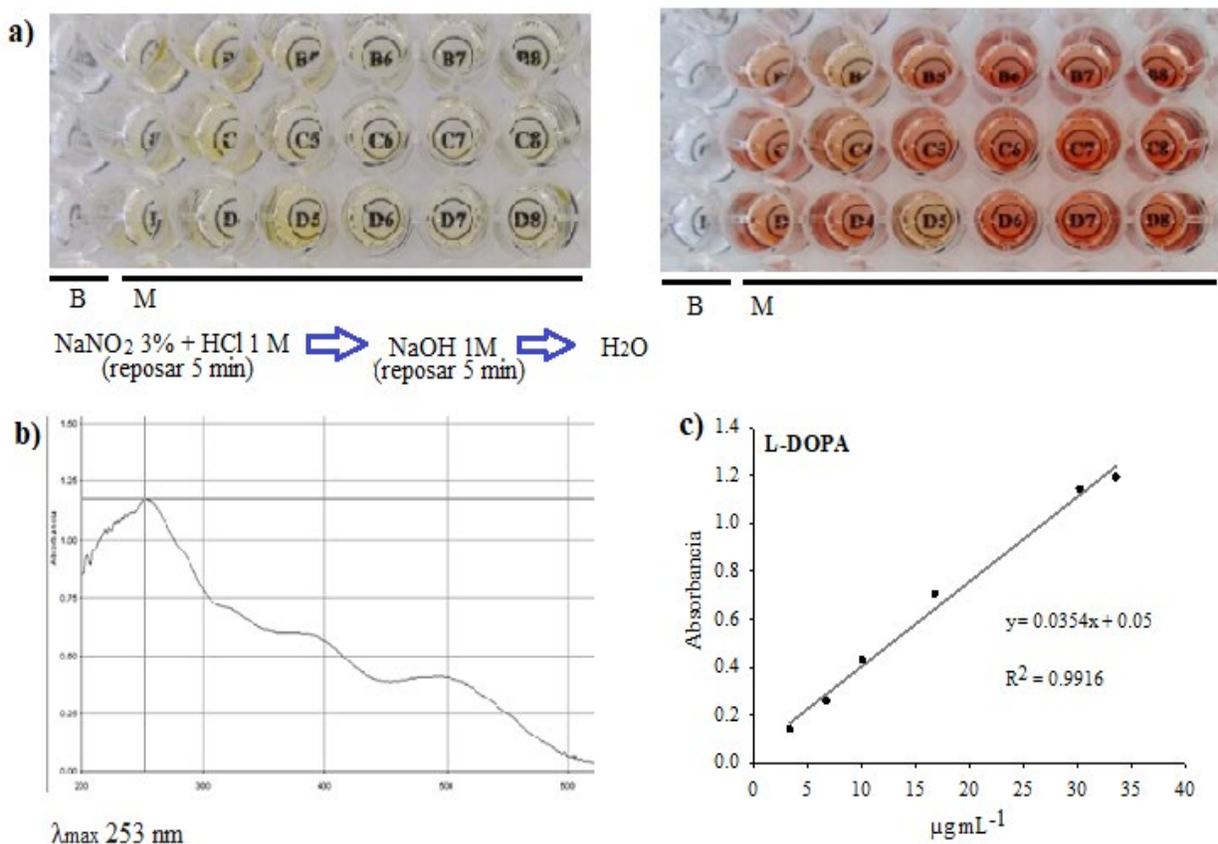


Figura 4.5 Determinación de L-DOPA por espectrofotometría UV-visible en microplaca, a) reactivos y coloración de la reacción para la determinación de L-DOPA, b) espectro de absorción de 200 – 600 nm, c) curva de calibración.

Actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

Extracción. Se pesaron 5 mg de polvo de planta de haba y se agregaron 5 mL de metanol. La mezcla se agito con vórtex y posteriormente se colocó en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, AS5150B) durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 7 000 rpm a 4°C durante 5 min (HERMLE

Labortechnik, Z 326 K) y el sobrenadante se colocó en eppendorf para ser almacenados en congelación a -20°C hasta su análisis.

Análisis. Para evaluar la actividad antioxidante del material vegetal se utilizó la metodología de actividad antioxidante por el método de 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de acuerdo con Viveros-Antonio (2018).

El extracto se diluyó con metanol para tener concentraciones de 40, 60, 80, 100, 130, 160 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se realizó un stock de DPPH (Sigma-Aldrich, D9132) a una concentración 1 mM. Se pesaron 39.432 mg de DPPH y se aforaron a 100 mL con metanol. La mezcla se sónico por 5 minutos. El stock de DPPH se guardó en refrigeración a 4°C (stock que dura dos semanas aproximadamente en refrigeración). Previo al análisis se tomaron 10 mL del stock y se aforaron a 100 mL con metanol para tener una concentración de 0.1 mM de DPPH. Con esta concentración se realizó el análisis de actividad antioxidante.

En una microplaca (Costar de 96 pozos de fondo plano de polipropileno) se colocaron 50 μL del extracto a las diferentes concentraciones (40, 60, 80, 100, 130, 160 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se agregaron 200 μL de DPPH (0.1 mM). Para el blanco se utilizaron 50 μL de metanol. Se colocó la placa dentro del espectrofotómetro (Thermo Scientific, Varioskan flash) y se programó el equipo para que la microplaca se agitara a una velocidad de 960 spm durante medio minuto para que las sustancias se mezclaran. Finalmente, se registró la absorbancia cada minuto a una longitud de onda de 521 nm durante un periodo de 30 min. Se observó que la absorbancia y la coloración violeta de la reacción van disminuyendo conforme transcurre el tiempo.

Con los resultados se obtuvo el porcentaje de inhibición (% I) de acuerdo a la Ecuación 4.1, que es el radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración.

Ecuación 4.1

$$\% I = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

Se calculó la concentración media inhibitoria o también denominado CI_{50} , que causa la reducción del 50 % de color y concentración del DPPH. Esta se obtiene graficando concentración contra % I a los 30 min y a través de la regresión lineal obtener la ecuación de la recta. Posteriormente de la ecuación de la recta, se despeja X, mientras que el valor de Y será 50 (representando el 50 % de

inhibición). De esta manera el valor de X representará la concentración de la muestra para lograr el 50 % de inhibición del DPPH, por lo que a mayor actividad oxidante el valor de CI_{50} será menor (Figura 4.6).

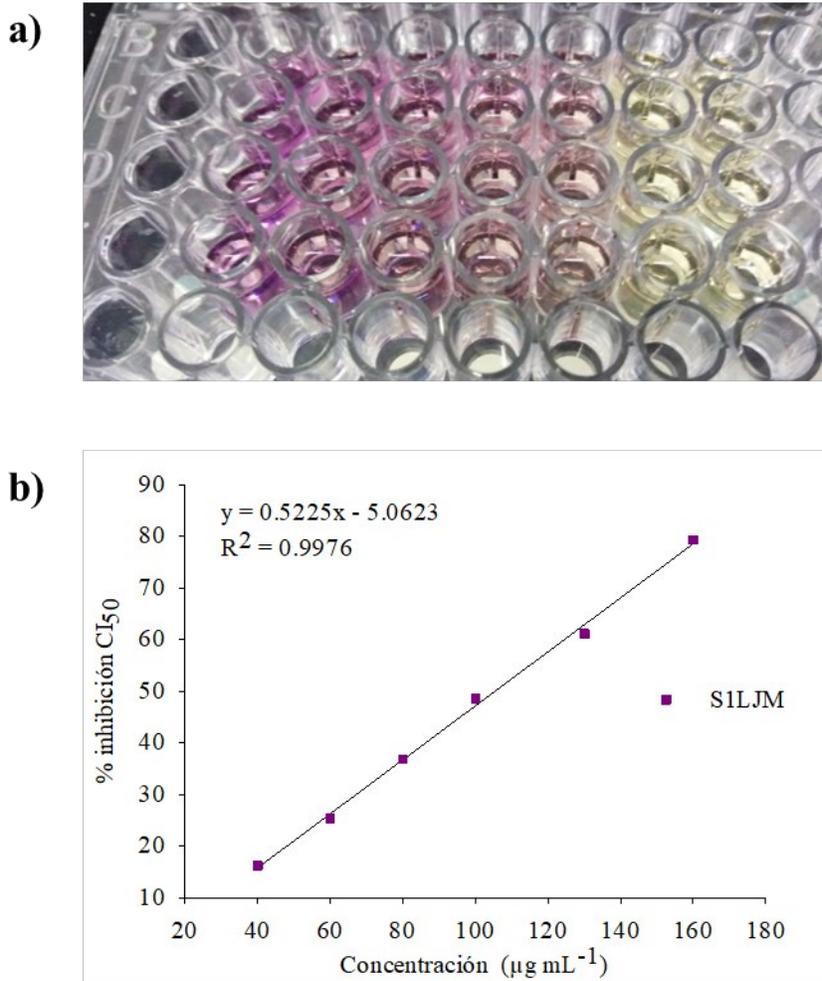


Figura 4.6 Actividad antioxidante por el método de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; a) imagen de la coloración de la reacción, b) obtención del CI_{50} de la variedad José María.

Ensayo de Actividad anti-inflamatoria *in vitro*

Extracción de la muestra. Se pesaron 2.5 g de polvo de tejido de planta de haba y se agregaron 100 mL de metanol (MERCK, MX0485-7). La mezcla se colocó en un baño ultrasónico por 10 minutos a potencia 5 (2 veces). Posteriormente la mezcla se filtró al vacío en un matraz kitasato con papel filtro No. 42 (Whatman, 1442-055), el filtrado se deposita en un matraz de bola a peso

constante. El extracto se concentró en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4000) a 37°C hasta sequedad. El matraz de bola se pesó con el extracto seco para poder obtener el rendimiento y seguidamente se re-suspendió con 2 mL de agua destilada para realizar las distintas concentraciones con agua destilada a 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg mL⁻¹ (Figura 4.7).



Figura 4.7 Procedimiento de la extracción para la determinación de la actividad anti-inflamatoria.

Análisis. El análisis se realizó de acuerdo a las metodologías propuestas por Mizushima y Kobayashi (1968) y Sakat *et al.* (2010) con modificaciones. El ensayo se basó en que las proteínas son desnaturizadas por la acción térmica y los fármacos con acción antiinflamatoria tienen la capacidad de estabilizar las proteínas (Mizushima y Kobayashi, 1968). En tubos de vidrio se colocaron 450 µL de albumina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich, 05470) diluida en agua destilada. Posteriormente a cada tubo se les agregó 50 µL de las distintas concentraciones del extracto, mientras que para el control negativo se utilizó 50 µL de agua desionizada (Figura 4.8). La mezcla se agitó con vórtex (Scientific industries, SI-A236) durante 10 s y seguidamente se colocaron en un baño de agua (Thermo Scientific, 2841) a 37°C durante 20 min, transcurrido ese tiempo se aumentó la temperatura del baño hasta 58°C y ahí se dejaron los tubos para que paulatinamente comenzara a subir la temperatura hasta que concluyera la incubación (proceso que tardó 30 – 32 min). Después los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les agregó 2.5 mL de buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) al 0.1 M a pH 6.3. El pH del buffer se ajustó con una solución de HCl al 1N. La turbidez [proteína desnaturizada por la acción

térmica] se midió con un espectrofotómetro (ThermoElectron Corporation, Evolution 300) a 660 nm contra el vehículo PBS. El experimento fue realizado por triplicado. El porcentaje de inhibición fue calculado con la Ecuación 4.2. Con los resultados se realizó un análisis de regresión lineal para obtener el valor de CI50.

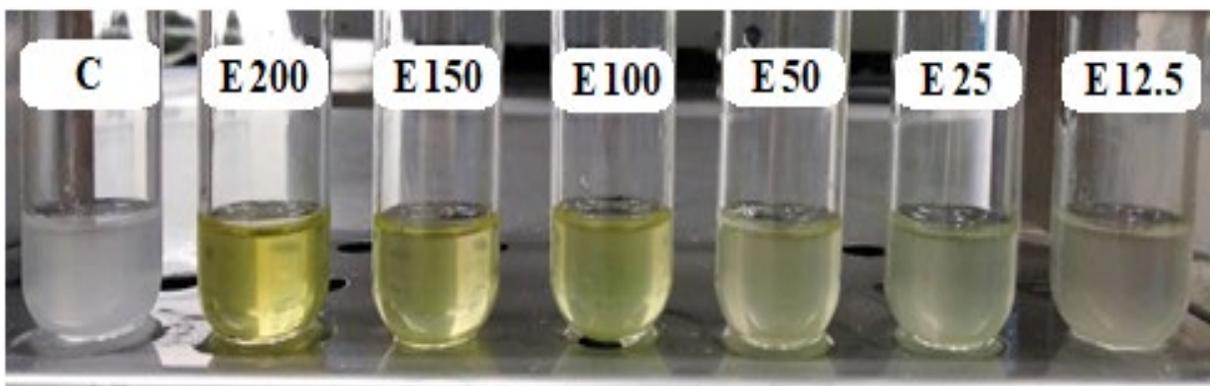


Figura 4.8 Actividad anti-inflamatoria de extractos de tejidos de planta de haba a distintas concentraciones (12.5 – 200 mg mL⁻¹). C: Control negativo, E: extracto.

Ecuación 4.2

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control negativo} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control negativo}} \times 100$$

Como control positivo se utilizó diclofenaco sódico en ampolleta (Pharmalife[®]), para observar el efecto de la inhibición de la desnaturalización de la proteína de suero bovino. El diclofenaco sódico fue diluido con solución isotónica de NaCl (J.T. Baker, 3624-01) para obtener las concentraciones de 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 100 µg mL⁻¹ y ser evaluadas (Figura 4.9).

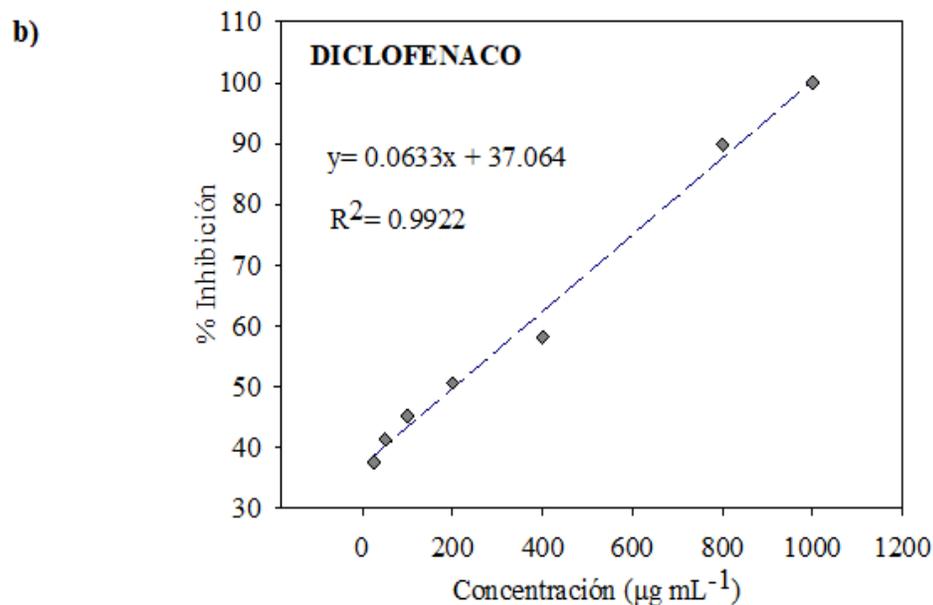
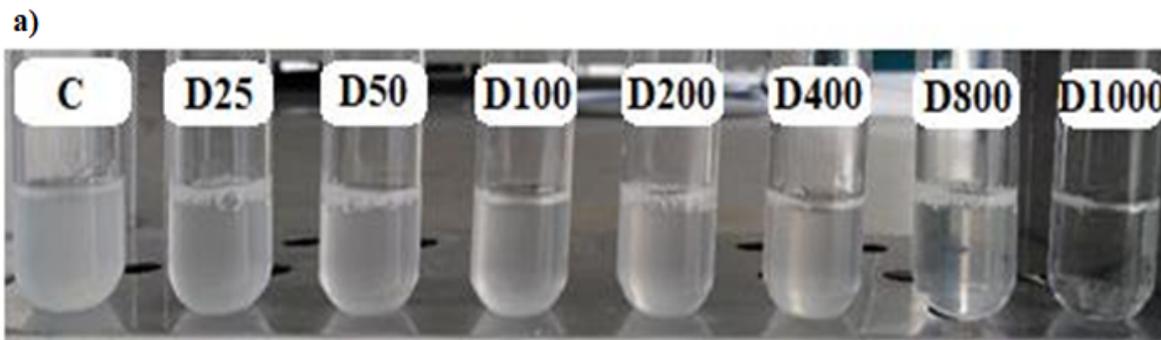


Figura 4.9 Efecto del diclofenaco sódico en la inhibición de la turbidez a distintas concentraciones (25 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). a) Imagen del ensayo C: Control negativo, D: diclofenaco, b) gráfico del porcentaje de inhibición.

Determinación de L-DOPA, rutina e isoorientinas por HPLC

Extracción. Se pesaron 3 g de polvo de tejido de planta de haba y se agregaron 100 mL de metanol (MERCK, MX0485-7). La mezcla se colocó en un baño ultrasónico por 10 minutos a potencia 5 (2 veces). Posteriormente la mezcla se filtró al vacío en un matraz kitasato con papel filtro No. 42 (Whatman, 1442-055), el filtrado se colocó en un matraz de bola. El extracto se concentró en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4000) a 37°C hasta sequedad. El extracto se raspó para posteriormente ser pesado en una balanza analítica, se depositó en frasco ámbar y se almacenó en refrigeración (-4 °C) hasta su análisis.

Análisis: Se tomó una parte de los extractos y se diluyeron con metanol 100 % a una concentración de 2 mg mL⁻¹. Para el análisis se utilizó un equipo HPLC (Waters, modelo Alliance 2695) con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996) y una columna SUPELCO C18 (25 mm longitud x 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) (Sigma-Aldrich, 504971). Las fases móviles empleadas fueron con solventes grado HPLC. Fase móvil A: agua acidulada (agua con 0.5 % TFA: ácido trifluoroacético) y fase móvil B: acetonitrilo. Se utilizó un gradiente durante un tiempo de corrida de 30 min (Cuadro 4.2). Se inyectaron 10 µL de muestra con un flujo de 0.9 mL min⁻¹. La temperatura de la columna fue de 27°C y la presión en la que se mantuvo el equipo fue 1528 psi. La detección de los compuestos fue 280 y 350 nm. La curva de calibración se realizó con los respectivos estándar L-DOPA (Sigma, PHR1271), rutina (Sigma, R5143) e isoorientinas (Sigma, I1536) los cuales se disolvieron con 100 % metanol para realizar las respectivas curvas de calibración en los rangos de 31.25 – 1000 µg mL⁻¹, 12.5 – 200 µg mL⁻¹ y 12.5 – 200 µg mL⁻¹. El tiempo de retención de los estándares fue L-DOPA 4.55 min, rutina 8.6 min e isoorientinas 8.69 y 8.84 min (Figura 4.10). Por los insumos y el tiempo requerido para estas determinaciones se consideraron a las 4 variedades de haba con 3 repeticiones.

Cuadro 4.2 Gradiente para la utilización de las fases móviles.

| Tiempo (min) | Fase Móvil | |
|--------------|------------|-------|
| | A (%) | B (%) |
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 100 | 0 |
| 3 | 95 | 5 |
| 4 | 95 | 5 |
| 20 | 70 | 30 |
| 21 | 50 | 50 |
| 22 | 50 | 50 |
| 23 | 50 | 50 |
| 24 | 20 | 80 |
| 25 | 20 | 80 |
| 26 | 0 | 100 |
| 27 | 0 | 100 |
| 28 | 100 | 0 |
| 30 | 100 | 0 |

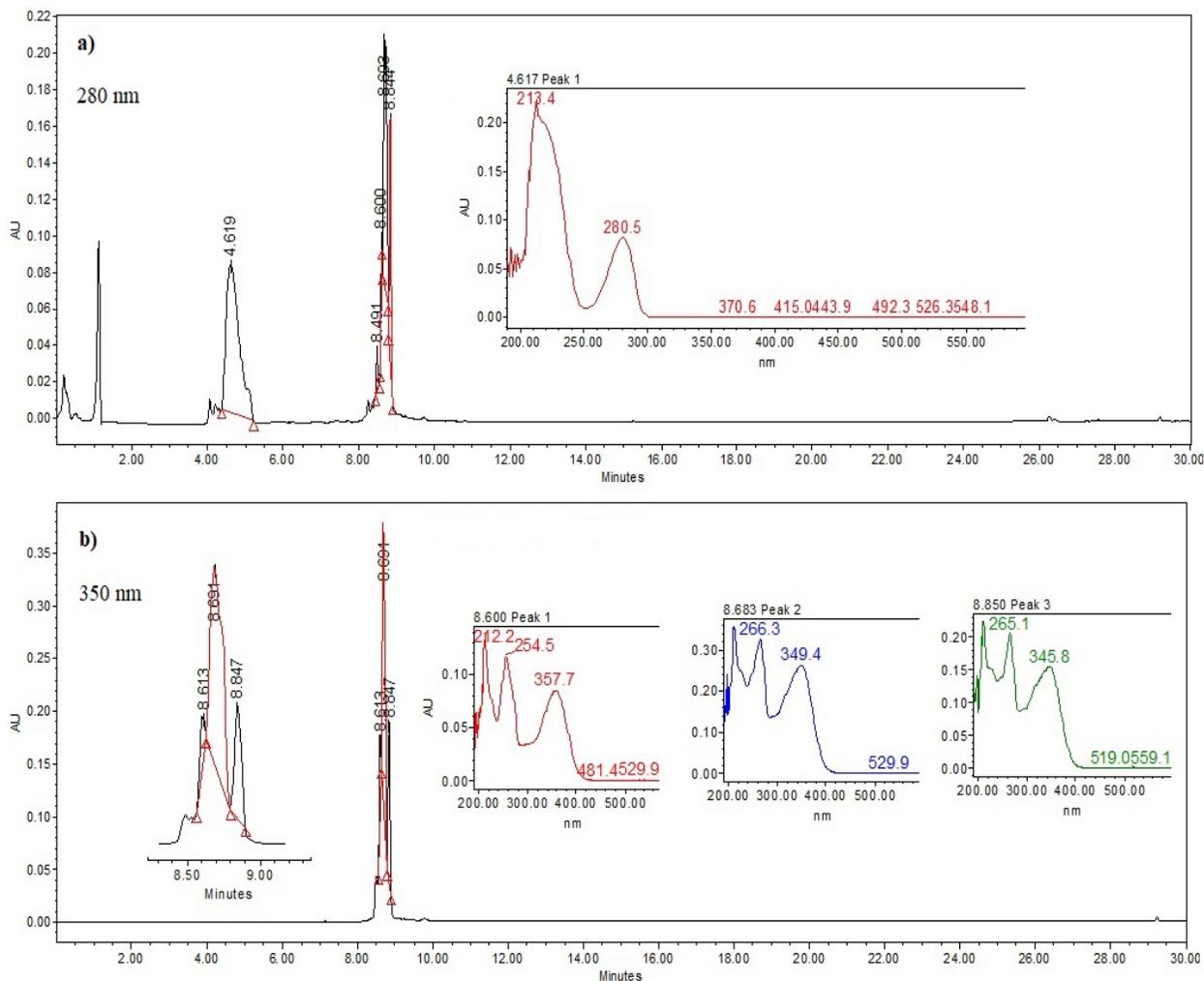


Figura 4.10 Cromatograma del extracto metanólico de planta de *Vicia faba*, a) L-DOPA (pico 1) a 280 nm, b) rutina (pico 1) e isorientinas (pico 2 y 3) a 350 nm.

Análisis estadísticos

Para los resultados de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, L-DOPA determinados en espectrofotometría UV-visible, y para las actividades antioxidante y anti-inflamatoria en extractos de las plantas de haba, bajo un diseño de bloques completos al azar, se realizaron análisis de varianza (ANOVA), prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$ y correlaciones de Pearson.

Los resultados obtenidos con el equipo HPLC de L-DOPA, rutina e isorientinas, al igual que la biomasa y rendimientos se analizaron bajo un diseño completamente al azar, en donde se realizaron

los análisis estadísticos: análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SAS versión 9.

4.3 Resultados y Discusión

Evaluación de la metodología de extracción y cuantificación de L-DOPA

Se evaluó la concentración del ácido acético de la solución extractora al 0.1 0.2 y 0.3 %, en donde los resultados (86.64, 98.68 y 49.34 mg g⁻¹ MS, respectivamente) evidenciaron que la concentración de 0.2 % fue la que extrajo una mayor cantidad de L-DOPA. Una extracción de solución acuosa con ácido acético es mejor solvente que el agua para la extracción de L-DOPA, esto podría deberse a la disociación de L-DOPA en condiciones ácidas (Polanowska *et al.*, 2019) Así mismo Inamdar *et al.* (2012) indican que el pH es un factor crítico para el rendimiento de la extracción de este metabolito. En polvo de semillas de *Mucuna monosperma*, la L-DOPA fue más soluble en pH ácido (pH 4.0) alcanzando un rendimiento de 5.48 % con base en peso seco a diferencia de pH 7 o 9 que tuvieron rendimientos menores (4.96 y 4.18 % en peso seco, respectivamente).

No fue necesario realizar una segunda extracción como lo propone Polanowska *et al.* (2019), ya que en los extractos del tejido de la planta de haba se observó que el aumento del contenido de L-DOPA fue bajo (14 %), a diferencia de lo que obtuvieron los autores con las semillas de haba (35 %).

Al adaptar el método espectrofotométrico de una celda para la cuantificación de L-DOPA a un método espectrofotométrico en microplaca de 96 pocillos, se detectó que el gasto de insumos se redujo 100 veces y el tiempo para determinar las muestras es más eficiente, ya que, en lugar de analizar solo una muestra con una celda en un tiempo estimado de 20 minutos, se pueden determinar alrededor de 40 muestras en ese mismo periodo de tiempo.

Análisis de varianza de compuestos bioactivos

El análisis de varianza de los resultados de CFT, FT, L-DOPA, DPPH (CI₅₀) y AANTI (CI₅₀) de las plantas de variedades de haba, indicó que hubo efecto significativo ($p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$) en casi todas las variables, excepto en AANTI (CI₅₀), posiblemente debido a que los compuestos que

confieren la actividad antiinflamatoria presentan poca variación entre variedades. Por fuente de variación, variedad (VAR) mostró tener efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) en todas las variables a excepción de AANTI (CI₅₀), mientras que germinación (GER) y la interacción de VAR*GER solo la variable CFT presentó efecto altamente significativas ($p \leq 0.01$) (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Análisis de varianza de compuestos bioactivos en plantas de variedades de *Vicia faba* L. de 20 días después de la emergencia.

| Variable | Media | CV (%) | Cuadrados Medios | | |
|---------------------------|---------|--------|------------------|----------|---------|
| | | | VAR | GER | VAR*GER |
| CFT | 126.53* | 9.42 | 868.20** | 427.61** | 15.55** |
| FT | 103.62* | 13.64 | 1424.17** | 0.05 | 63.18 |
| L-DOPA | 78.81* | 13.94 | 587.31* | 2.94 | 77.29 |
| DPPH (CI ₅₀) | 96.92** | 5.31 | 398.03** | 28 | 41.85 |
| AANTI (CI ₅₀) | 87.74 | 19.57 | 416.54 | 0.92 | 334.35 |

VAR: variedad, GER: germinación, CFT: compuestos fenólicos totales (mg EAG g⁻¹ MS), FT: flavonoides totales (mg EQ g⁻¹ MS), L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina (mg g⁻¹ MS), DPPH: actividad antioxidante frente al radical DPPH (CI₅₀) (μg mL⁻¹), AANTI: actividad anti-inflamatoria (CI₅₀) (mg mL⁻¹), CV: Coeficiente de variación. NS: Estadísticamente no significativo, * $p \leq 0.05$: Efecto significativo, ** $p \leq 0.01$: Efecto altamente significativo.

Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y L-DOPA

El contenido más alto de CFT presentado en las plantas de variedades de haba de 20 DDE fue en la variedad Matlatzintla (135.62 mg EAG g⁻¹ MS), la cual no fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) a la variedad Rojita (131.64 mg EAG g⁻¹ MS) (Figura 4.11). Los contenidos de CFT en las plantas de las cuatro variedades de haba (111.82 - 135.62 mg EAG g⁻¹ MS) fueron mayores a los reportados por Ortiz *et al.* (2019) (94.16 mg EAG g⁻¹ MS) (Cuadro 4.1A del Anexo 4A). Al parecer los contenidos de CFT en plantas son superiores a los presentados en las semillas de haba de otros estudios. Por ejemplo, en las variedades botánicas *major* y *minor* tuvieron valores de 2.62 y 4.3 mg EAG g⁻¹ MS, respectivamente (Valente *et al.*, 2019). Sin embargo, Boudjou *et al.* (2013) reportan valores en las variedades *major* y *minor* de 30.93 y 42.44 mg g⁻¹ MS de equivalente de catequina, respectivamente.

El contenido de FT en las plantas de las variedades de haba muestra que las variedades Matlatzintla y Rojita tuvieron los contenidos más altos y no fueron diferentes estadísticamente (118.58 y 111.17 mg EQ g⁻¹ MS, respectivamente) (Figura 4.11). Los contenidos de FT en plantas de haba son

superiores a lo cuantificado en haba verde completa (testa + cotiledón) de la variedad *major* 0.11 mg g⁻¹ EQ MS y *minor* 0.14 mg g⁻¹ EQ MS (Boudjou *et al.*, 2013).

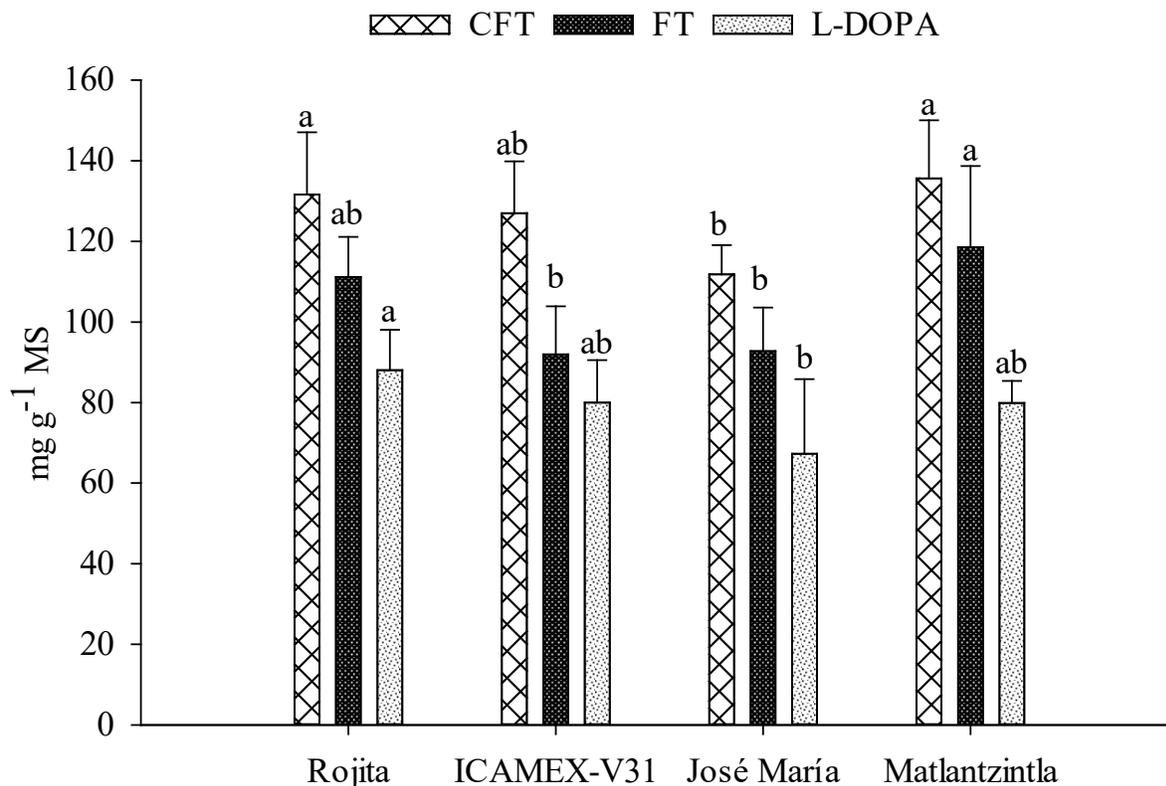


Figura 4.11 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y L-DOPA en plantas de variedades de haba. Los datos son la media \pm desviación estándar. Medias con letras distintas entre variedad por cada compuesto son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Respecto al contenido de L-DOPA, la variedad Rojita presentó el contenido más alto (88.04 mg g⁻¹ MS), pero no fue diferente estadísticamente ($p \leq 0.05$) a las variedades ICAMEX-V31 y Matlantzintla. Mientras que la variedad José María presentó el contenido más bajo (67.30 mg g⁻¹ MS) (Figura 4.11) (Cuadro 4.1A del Anexo 4A).

En plantas consideradas medicinales de otras especies se pueden encontrar contenidos inferiores de compuestos bioactivos a diferencia de los contenidos presentados en este estudio. Por ejemplo, las flores de diferentes especies medicinales silvestres, tales como *Crataegus monogyna*, *Cytisus*

multiflorus, *Malva sylvestris* y *Sambucus nigra*, tienen contenidos de CFT que varían de 5 – 55 mg g⁻¹ MS (Barros *et al.*, 2012). Al igual en plantas medicinales reconocidas en la India presentan contenidos menores de CFT y FT como en *Aerva lanata* (0.227 mg EAG g⁻¹ MS y 0.069 mg EQ g⁻¹ MS), *Hygrophila schulli* (0.075 mg EAG g⁻¹ MS y 0.003 mg EQ g⁻¹ MS) y *Biophytum reinwardtii* (0.135 mg EAG g⁻¹ MS y 0.018 mg EQ g⁻¹ MS) (Sulaiman y Balachandran, 2012).

Actividad Antioxidante (DPPH)

Los extractos de metanol de plantas de variedades de haba de 20 DDE mostraron un nivel alto de actividad captadora de radicales. A la concentración de 200 µg mL⁻¹ se presentó su máximo porcentaje de inhibición, alrededor de 80 % a los 10 min de la reacción (Figura 4.12). Entre las variedades de haba, la variedad Rojita tuvo una mayor actividad antioxidante (CI₅₀ = 87.68 µg mL⁻¹) y fue diferente estadísticamente a las variedades José María y Matlatzintla (Cuadro 4.1A del Anexo 4A). Ortiz *et al.* (2019) también reportó actividad antioxidante en extractos de plantas de variedades de haba de 20 DDE, sin embargo, los valores de actividad antioxidante fueron menores a lo reportado en este estudio (Diamante CI₅₀ = 121.04 µg mL⁻¹ y Zac-22 CI₅₀ = 130.27 µg mL⁻¹). Esta actividad antioxidante puede atribuirse al contenido alto de L-DOPA que se encontró en los tejidos de la planta de haba (Cuadro 4.3), ya que un estudio revela que, en extractos de germinados de haba, este metabolito contribuyó altamente en la actividad antioxidante a diferencia de los glucósidos de kaempferol (Okumura *et al.*, 2016).

En los tejidos de *V. faba* se presenta una actividad antioxidante mayor a diferencia del fruto o de otros tejidos de otras especies. Ya que el estudio de Okumura *et al.* (2016) demuestra que los germinados de haba tienen un mayor porcentaje de actividad captadora de radical DPPH a 100 µg mL⁻¹ (70 % aproximadamente), a diferencia del haba (fruto) (10 % aproximadamente) y de los germinados de rábano blanco, brócoli y col roja (15, 12 y 25 % aproximadamente, respectivamente). Sin embargo, se ha demostrado que la actividad antioxidante de *V. faba* depende de algunos factores como: el estado de madurez, el tejido o fracción de haba que se esté evaluando, así como de los métodos de cocción (Boukhanouf *et al.*, 2016).

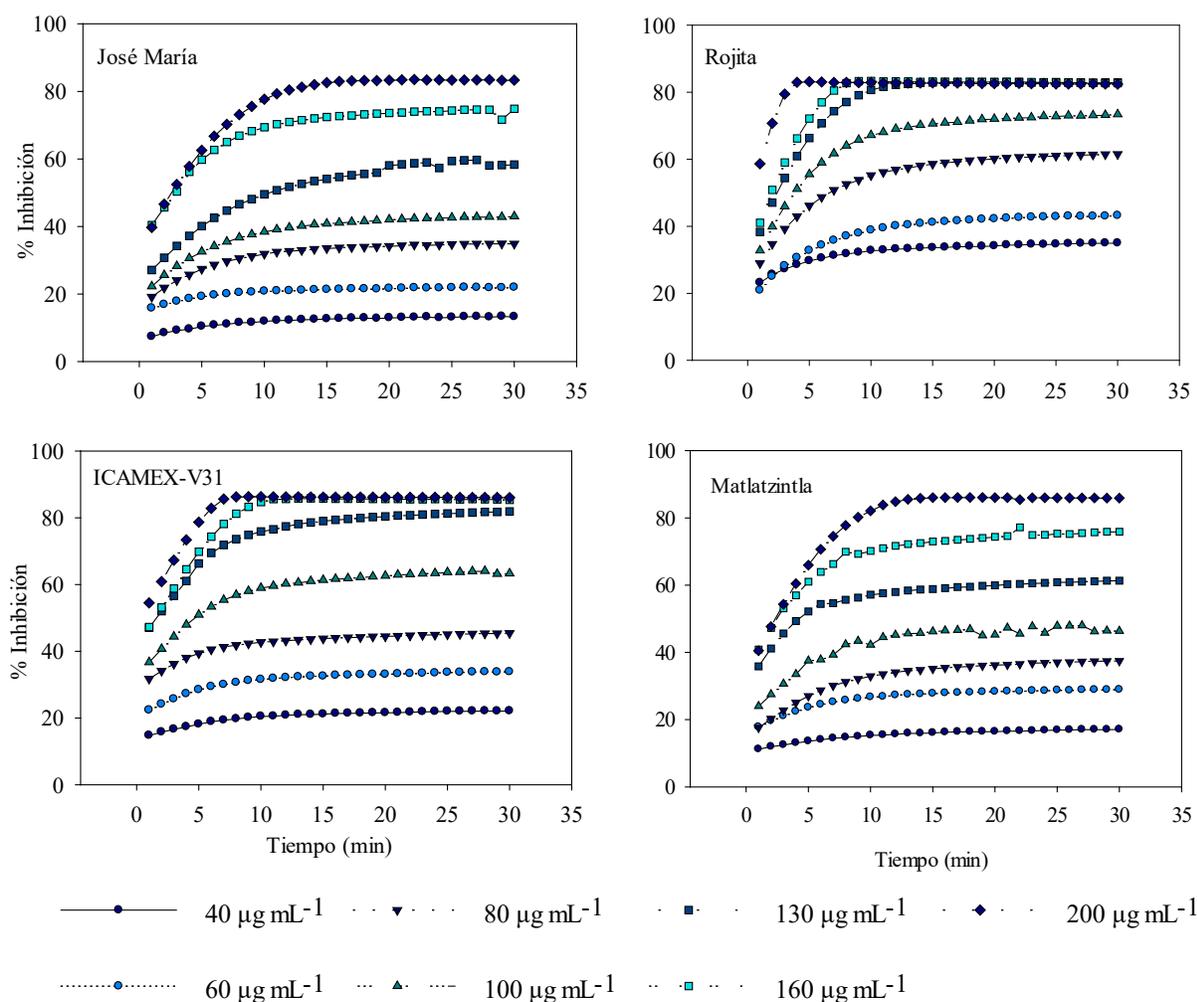


Figura 4.12 Actividad antioxidante reportada como porcentaje de inhibición (% I) de los extractos de la planta de variedades de *Vicia faba* L. de 20 días después de la emergencia.

Actividad anti-inflamatoria *in vitro*

Es la primera vez que se reportan los resultados de un ensayo de actividad anti-inflamatoria *in vitro* con extractos de tejidos de planta de haba. Con la concentración de los extractos de 12.5 a 200 mg mL⁻¹ se observa como el porcentaje de inhibición se incrementa en todas las variedades de haba (Figura 4.13 a). El porcentaje de inhibición a 150 mg mL⁻¹ muestra que la variedad Rojita tiene el mayor porcentaje (76 %) (Figura 4.13 b). El CI₅₀ de la AANTI en promedio fue de 87.74 mg mL⁻¹, siendo la variedad Rojita la que presentó la máxima actividad anti-inflamatoria con un

CI₅₀ de 74.40 mg mL⁻¹ sin presentar diferencias estadísticas con las demás variedades de haba (Cuadro 4.1A del Anexo 4A).

El fármaco diclofenaco sódico es un antiinflamatorio, el cual su principal mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, por inactivación reversible de la enzima ciclooxigenasa (Clària, 2001). Dicho medicamento se usó en el ensayo como referencia para ver la inhibición de la turbidez provocada por la desnaturalización de la proteína de albumina de suero bovino inducida por el calor. El CI₅₀ del diclofenaco sódico (a una concentración de 25 a 1000 µg mL⁻¹) fue de 204.36 µg mL⁻¹, por lo que el efecto del fármaco fue mayor a diferencia de los extractos de variedades de haba (Rojita CI₅₀=74.40 mg mL⁻¹, ICAMEX-V31 CI₅₀=99.14 mg mL⁻¹, José María CI₅₀= 90.22 mg mL⁻¹, Matlatzintla CI₅₀=87.87 mg mL⁻¹). El efecto inhibitorio de la desnaturalización de la albumina de suero bovino se ha demostrado en otras especies como en el extracto de la planta de la especie *Oxalis corniculata* que tuvo 85.92 % de inhibición con 0.8 mg mL⁻¹ (CI₅₀ de 0.288 mg mL⁻¹) (Sakat *et al.*, 2010). Mientras que el extracto de hojas de *Syzygium zeylanicum* con 0.25 mg mL⁻¹ mostró 76.92 % de inhibición (Anoop y Bindu, 2015).

En el presente estudio se comprobó que el tejido de la planta de haba tiene un efecto antiinflamatorio *in vitro* frente a la desnaturalización de proteínas. Este efecto puede deberse al tipo de polifenoles encontrados en el tejido vegetal.

También se ha comprobado que en extractos etanólicos de la testa de haba hay actividad antiinflamatoria *in vitro* con inhibidores de lipoxigenasa (15-LOX), en donde se encontró que 114.1 µg mL⁻¹ de la variedad *minor* y 192.2 µg mL⁻¹ de la variedad *major* inhiben un 50% de la enzima LOX (Boudjou *et al.*, 2013).

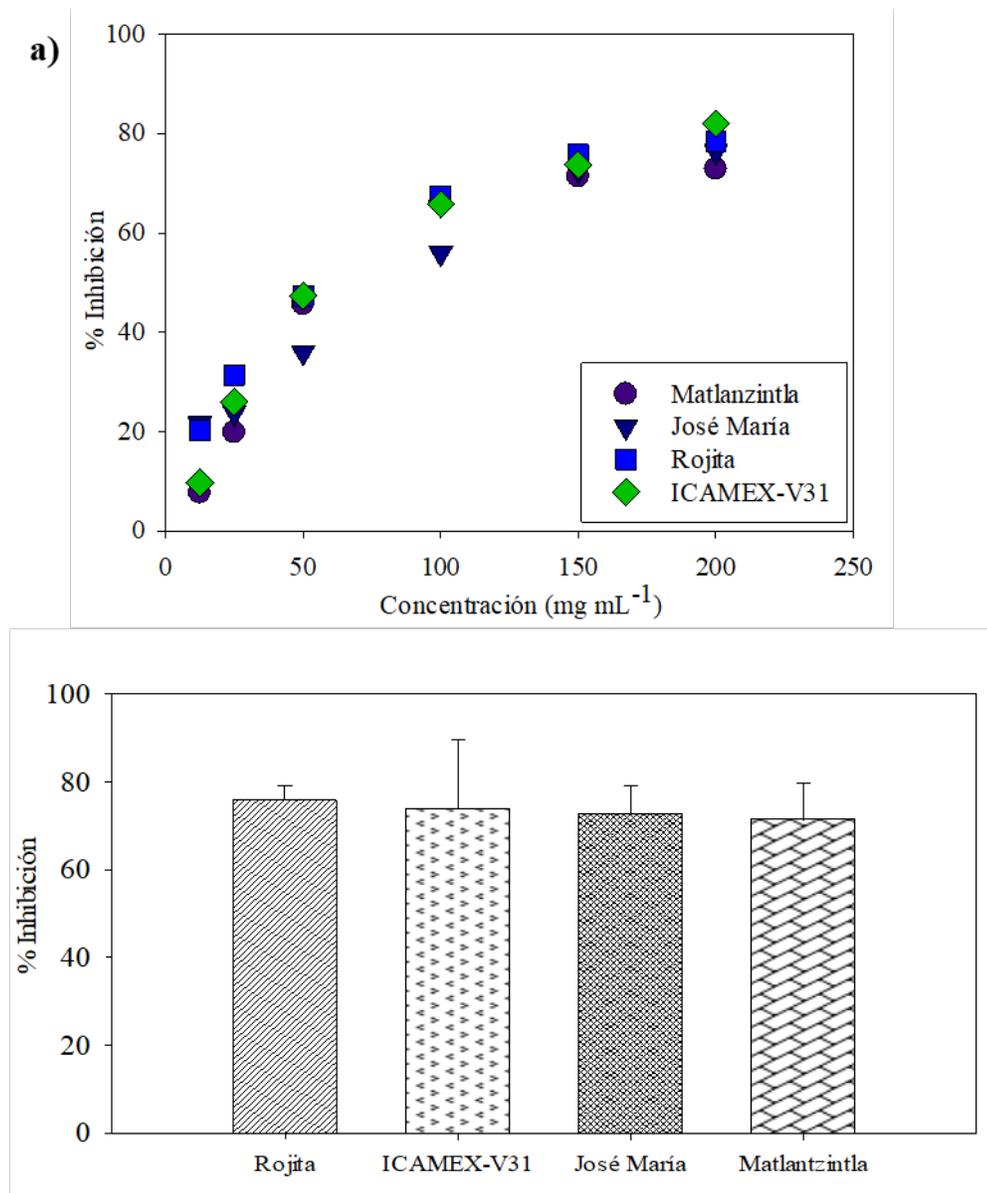


Figura 4.13 Actividad anti-inflamatoria de extractos de planta de variedades de haba, a) Porcentaje de inhibición de 12.5 a 200 mg mL⁻¹, b) Porcentaje de inhibición de la actividad anti-inflamatoria a 150 mg mL⁻¹.

Correlaciones de compuestos bioactivos y actividad biofuncional

Entre las variables analizadas, solo algunas presentaron correlación. Compuestos fenólicos correlacionaron positivamente con flavonoides ($r = 0.55247^{**}$), así como se presentó en extractos de haba ($r=0.558^{**}$) (Boukhanouf *et al.*, 2016). También, compuestos fenólicos tuvieron correlación positiva débil pero significativa con L-DOPA ($r = 0.35554^*$), esto es posiblemente

debido a que L-DOPA forma parte del grupo de compuestos fenólicos (Soares *et al.*, 2014). Además, el contenido de compuestos fenólicos mostró una correlación negativa moderadamente alta con DPPH (CI₅₀) ($r = -0.58127^{**}$), sin embargo, a diferencia de los resultados en este estudio, en extractos de haba los compuestos fenólicos presentaron una correlación positiva alta con DPPH ($r = 0.993^{**}$) (Boukhanouf *et al.*, 2016). Esta diferencia en correlación se pudo deber a que la actividad antioxidante se expresó con el valor de CI₅₀ (la concentración media inhibitoria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%), por lo que a mayor contenido de compuestos fenólicos menor va ser el valor de CI₅₀, por su efecto antioxidante. Mientras que Boukhanouf *et al.* (2016) expresaron el valor de actividad antioxidante considerando al ácido gálico como estándar (miligramo de ácido gálico equivalente por gramo de MS, mg EAG g⁻¹ MS), así que a mayor contenido de compuesto fenólico, mayor será la actividad antioxidante. L-DOPA tuvo una correlación negativa moderadamente alta con DPPH (CI₅₀) ($r = -0.57112^{**}$) (Cuadro 4.4). La correlación puede atribuirse a que la L-DOPA contribuye con la actividad antioxidante (Okumura *et al.*, 2016).

Cuadro 4.4 Coeficiente de correlación de Pearson de compuestos bioactivos y actividad biofuncional de plantas de variedades de haba de *Vicia faba* L. de 20 DDE.

| | CFT | FT | L-DOPA | DPPH(CI ₅₀) | AANTI |
|--------------------------|-----|-----------|----------|-------------------------|----------|
| CFT | 1 | 0.55247** | 0.35554* | -0.58127** | -0.32703 |
| FT | | 1 | 0.17007 | -0.25052 | -0.18082 |
| L-DOPA | | | 1 | -0.57112** | -0.23207 |
| DPPH (CI ₅₀) | | | | 1 | 0.52124 |

CFT: compuestos fenólicos totales, FT: flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina, DPPH: actividad antioxidante (CI₅₀) frente al radical DPPH, AANTI: actividad anti-inflamatoria (CI₅₀). * $p < 0.05$: estadísticamente significativo, ** $p < 0.01$: estadísticamente muy significativo.

Rendimiento de compuestos bioactivos

Entre las variedades de plantas, la biomasa en materia fresca varió de 10.58 - 16.28 g, siendo la variedad José María la que presentó mayor biomasa mientras que la variedad Matlatzintla tuvo la menor. Por unidad de superficie la variedad José María tuvo una mayor cantidad de biomasa (639.59 g m⁻² MF) y fue estadísticamente diferente a las demás (Cuadro 4.5).

De igual forma el contenido de la biomasa en materia seca de la variedad José María fue mayor (2.11 g), en contraste con la variedad Matlatzintla con el contenido menor (1.46 g). Por unidad de superficie la variedad José María tuvo una mayor cantidad de biomasa (83.25 g m⁻² MS) y fue estadísticamente diferente a las demás. Estas tendencias fueron similares a lo presentado en la biomasa evaluada en materia fresca (Cuadro 4.5).

Con los datos del estudio se calculó el rendimiento de compuestos fenólicos, flavonoides y L-DOPA estimados en g planta⁻¹, g kg⁻¹ y g m⁻², considerando que el rendimiento es el producto de la concentración del metabolito por su biomasa (Bumgarner *et al.*, 2012; Etemadi *et al.*, 2018a, 2018b). Los resultados variaron entre las diferentes variedades de haba mexicanas. De compuestos fenólicos se tuvieron rendimientos de 111.77 – 131.65 g kg⁻¹ MS y de 7.58 – 9.30 g m⁻² MS. Para flavonoides se encontraron rendimientos de 0.16 – 0.21 g planta⁻¹ MS y de 113.57 – 92.17 g kg⁻¹ MS. De L-DOPA se encontraron contenidos que van de 0.11 – 0.17 g planta⁻¹ MS, mientras que se pueden encontrar de 67.81 – 87.53 g kg⁻¹ MS. Sin embargo, se observa que los rendimientos más altos evaluados por área se obtuvieron de las plantas de la variedad José María: CFT (9.30 g m⁻² MS), FT (8.08 g m⁻² MS) y L-DOPA (5.64 g m⁻² MS), mientras que los rendimientos mayores evaluados por planta se encontraron en la variedad Rojita: CFT (0.25 g planta⁻¹ MS), FT (0.21 g planta⁻¹ MS) y L-DOPA (0.17 g planta⁻¹ MS) (Cuadro 4.5). Se puede observar que tanto el contenido del metabolito como la biomasa son parámetros indispensables para evaluar los rendimientos en distintas variedades y de esta manera tener un mejor parámetro de selección.

Los rendimientos generados de compuestos bioactivos en *V. faba* o en otra especie son importantes para considerar una producción masiva para su obtención y posible utilización como productos naturales en el tratamiento o prevención de enfermedades crónicas.

Cuadro 4.5 Biomasa y rendimiento de compuestos bioactivos por planta, por kilogramo y por metro cuadrado de cuatro variedades de haba.

| | Rojita | ICAMEX-V31 | José María | Matlatzintla |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Biomasa (g planta ⁻¹ MF) | 15.24a ± 0.43 | 12.57b ± 0.24 | 16.28a ± 0.35 | 10.58c ± 0.81 |
| Plantas frescas (g m ⁻² MF) | 471.82b ± 13.60 | 434.94b ± 53.24 | 639.59a ± 13.92 | 407.84b ± 51.05 |
| Biomasa (g planta ⁻¹ MS) | 1.97a ± 0.03 | 1.73b ± 0.01 | 2.11a ± 0.03 | 1.46c ± 0.12 |
| Plantas secas (g m ⁻² MS) | 61.12b ± 1.18 | 59.71b ± 5.97 | 83.25a ± 1.25 | 56.55b ± 8.24 |
| <i>CFT</i> | | | | |
| g planta ⁻¹ | 0.25a ± 0.00 | 0.21b ± 0.00 | 0.23ab ± 0.00 | 0.19c ± 0.01 |
| g kg ⁻¹ | 131.65a ± 15.43 | 127.03c ± 13.35 | 111.77d ± 9.10 | 131.28b ± 12.80 |
| g m ⁻² | 8.04ab ± 0.15 | 7.58ab ± 0.75 | 9.30a ± 0.14 | 7.42b ± 1.08 |
| <i>FT</i> | | | | |
| g planta ⁻¹ | 0.21a ± 0.00 | 0.16c ± 0.00 | 0.19b ± 0.00 | 0.16c ± 0.01 |
| g kg ⁻¹ | 111.03b ± 11.00 | 92.44c ± 13.78 | 92.17d ± 13.79 | 113.57a ± 19.22 |
| g m ⁻² | 6.78ab ± 0.13 | 5.52b ± 0.55 | 8.08a ± 0.12 | 6.42b ± 0.93 |
| <i>L-DOPA</i> | | | | |
| g planta ⁻¹ | 0.17a ± 0.00 | 0.13b ± 0.00 | 0.14b ± 0.00 | 0.11c ± 0.00 |
| g kg ⁻¹ | 87.53a ± 11.11 | 80.48b ± 10.99 | 67.81d ± 18.94 | 79.68c ± 10.05 |
| g m ⁻² | 5.34ab ± 0.10 | 4.80ab ± 0.48 | 5.64a ± 0.08 | 4.50b ± 0.65 |

CFT: compuestos fenólicos totales, FT: Flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4 dehidroxifenilalanina. Los datos se evaluaron por triplicado y se presentan los resultados de los valores medios ± la desviación estándar. Medias con letras distintas por hilera son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Rendimientos de extracciones y contenido de L-DOPA, rutina e isoorientina

El rendimiento de las extracciones varió entre las variedades, Rojita presentó el mayor rendimiento de extracción (19.27 %), sin embargo, no fue estadísticamente significativa a las variedades ICAMEX-V31 y José María. Mientras que la variedad Matlatzintla presentó el rendimiento de extracción más bajo (13.60 %) (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6 Rendimiento de la extracción con metanol de tejido de plantas de *Vicia faba*.

| Variedad | Rendimiento (%) |
|--------------|-----------------|
| Rojita | 19.27 a |
| ICAMEX-V31 | 17.67 ab |
| José María | 16.21 ab |
| Matlatzintla | 13.60 b |

El análisis de varianza presenta la media del contenido de L-DOPA (512.04 g Kg⁻¹), rutina (5.70 g Kg⁻¹) e isoorientinas (41.39 g Kg⁻¹) de los extractos metanólicos de las plantas de variedades de haba. Entre variedades L-DOPA muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) y rutina muestra diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7 Análisis de varianza de compuestos fenólicos en extracto metanólico de planta de haba.

| Variable | Media | CV (%) | Cuadrado medio | |
|---------------|--------|--------|----------------|----------|
| | | | Variedad | Error |
| L-DOPA | 512.04 | 15.34 | 36200.07* | 49374.24 |
| Rutina | 5.70 | 8.11 | 2.84** | 13.27 |
| Isoorientinas | 41.39 | 11.45 | 77.66NS | 22.49 |

Todos los compuestos están expresados en g Kg⁻¹ MS.

Entre las variedades de haba se observa que la Rojita muestra la acumulación mayor de los metabolitos analizados con alrededor de 700 g Kg⁻¹, además presentó el mayor contenido de rutina y L-DOPA, y de isoorientinas aunque no presentó el contenido más alto (35.34 g kg⁻¹) no fue estadísticamente diferente a las demás variedades. La variedad Matlatzintla presentó la menor acumulación de la suma de los metabolitos analizados, sin embargo, presentó el mayor contenido

de isoorientinas (46.07 g kg^{-1}) (Figura 4.14). Los resultados más detallados se presentan en el Cuadro 4.2A del Anexo 4A.

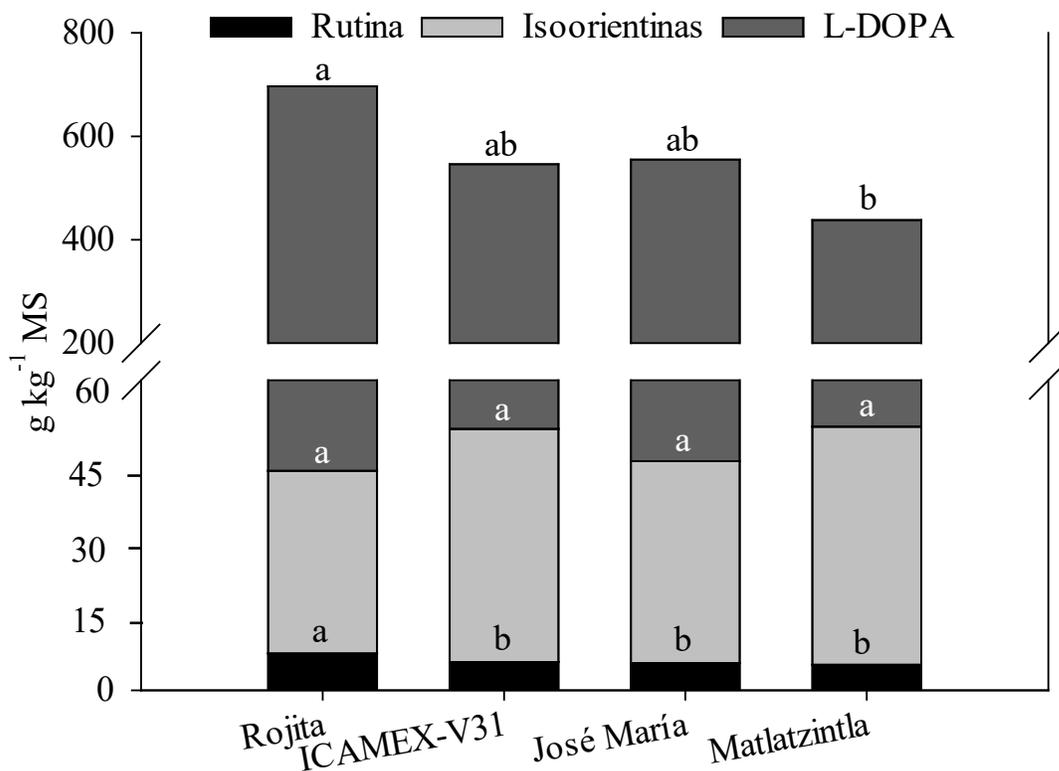


Figura 4.14 Contenido de rutina, isoorientinas y L-DOPA, en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L.

La rutina es un bioflavonoide (Figura 4.15), que se le atribuyen efecto antioxidante, antiinflamatorio, neuroprotector, nefroprotector, hepaprotector y antihiperglucémico, este último efecto contra complicaciones diabéticas incluye una disminución de la absorción de carbohidratos del intestino delgado, inhibición de la gluconeogénesis tisular, entre otros, que son ampliamente documentadas por Ghorbani *et al.* (2017).

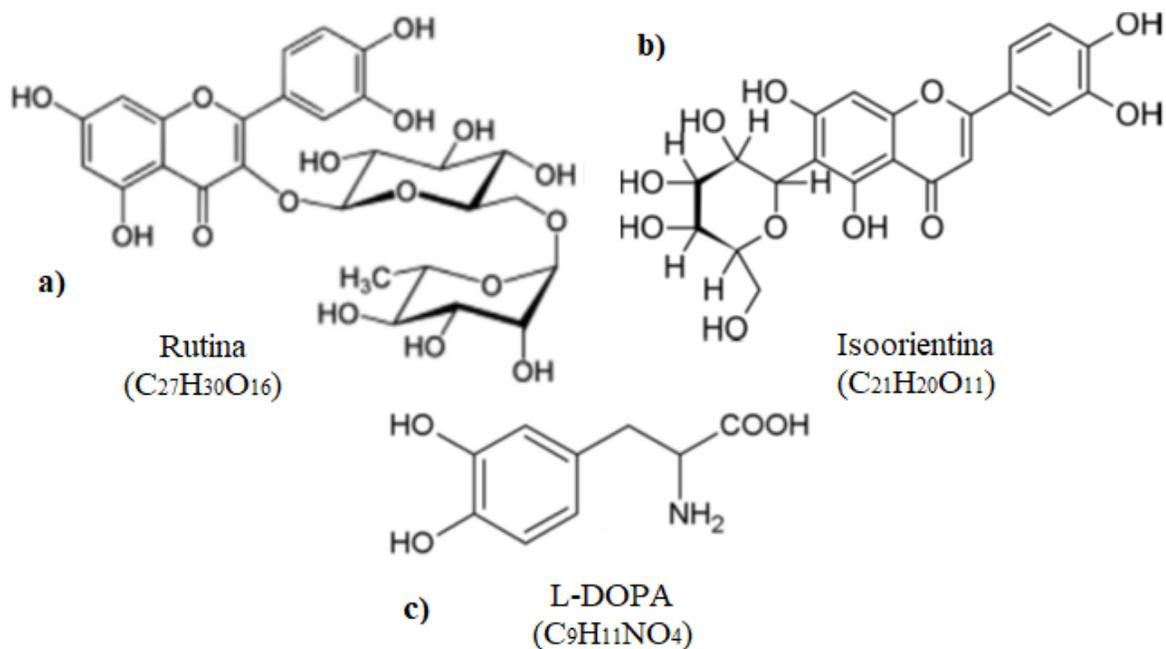


Figura 4.15 Estructuras moleculares de rutina (a), isoorientina (b) y L-DOPA (c) (Soares *et al.*, 2014; Gullón *et al.*, 2017; Ziqubu *et al.*, 2020).

La rutina por su efecto antioxidante tiene un amplio rango de aplicaciones farmacológicas, además a este compuesto se le atribuye que puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades crónicas como cáncer, diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia. En comparación con otros flavonoides, rutina es una molécula no tóxica y no oxidable (Sharma *et al.*, 2013). Sin embargo, una desventaja es su baja viabilidad, que es causada por su baja solubilidad en agua, poca estabilidad, limitada permeabilidad y baja liposolubilidad que limita su uso en aplicaciones tópicas (Gullón *et al.* 2017).

En el estudio el rango encontrado de rutina entre los extractos de las plantas de haba fue de 4.95 – 7.12 mg g⁻¹, siendo la variedad Rojita la que presentó el mayor contenido. Gullón *et al.* (2017) documenta el rendimiento de rutina de una serie de especies que tienen diferentes contenidos, entre estas, *Valeriana officinalis* L. 1.6 µg g⁻¹, *Amaranthus paniculatus* 14.3 mg g⁻¹, *Flos Sophorae Immaturus* 251.4 mg g⁻¹. Este metabolito tiene actividad anti-inflamatoria la cual se ha evaluado en diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* (Gullón *et al.*, 2017). Como en el trabajo de Hao *et al.* (2016) quienes evaluaron en modelos de ratones el efecto inhibitorio de la neuroinflamación y la

neuroprotección de la rutina, y encontraron que este metabolito puede mejorar lesiones como edema, destrucción de la barrera hematoencefálica, déficit neurológico y muerte neuronal.

La isoorientina es una C-glucosil flavona (Figura 4.15), y es un compuesto que se le atribuyen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antidiabéticas, antiobesidad y que puede atenuar complicaciones metabólicas. La literatura revela la presencia de isoorientinas en diversas plantas, principalmente en las que tienen propiedades altamente antioxidantes (Ziqubu *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de especies de plantas incluyen a *Aspalathus linearis*, *Sasa borealis*, *Patrinia villosa*, *Scabiosa stellata*, con contenidos de isoorientinas distintos que pueden ir de 0.01 – 8.04 g 100g⁻¹. En los extractos metanólicos de las plantas de haba se encontraron contenidos de 3.5 – 4.6 g 100 g⁻¹ por lo que podrían también ser importantes fuentes de extracción de este metabolito.

La isoorientina ha demostrado tener potentes propiedades antiinflamatorias tanto *in vitro* en líneas celulares de macrófagos de ratón como *in vivo* al reducir el edema de la pata en modelos de ratón (Anilkumar *et al.*, 2017). En este estudio se evaluó en extractos de la planta de haba un ensayo de actividad anti-inflamatoria *in vitro*, los resultados mostraron tener un efecto antiinflamatorio al compararlo con el fármaco diclofenaco sódico. Por lo que el efecto antiinflamatorio se le puede atribuir a la rutina e isoorientinas, compuestos presentes en los tejidos de la planta de haba.

La L-DOPA es un aminoácido no-proteico con estructura de un ácido fenólico (Siqueira-Soares *et al.*, 2013) (Figura 4.15). Como ya se mencionó anteriormente la L-DOPA es un compuesto fundamental para los enfermos de Parkinson. Este compuesto puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, para que en las neuronas dopaminérgicas se sintetice la dopamina, por la acción de la enzima L-dopa descarboxilasa (Nagatsu y Sawada *et al.*, 2009); que es el primer neurotransmisor de la catecolamina, de los tres existentes (dopamina, noradrenalina y adrenalina) (Gautam *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014).

La administración oral de L-DOPA, antes de llegar al cerebro puede catalizarse por dopa descarboxilasa, monoamina oxidasa y catecol O-metiltransferasa, lo cual en las personas puede provocar vómitos, náuseas entre otras afectaciones. Por lo que la administración conjunta de L-DOPA e inhibidores de enzimas descarboxilasas periféricas, mejoran la biodisponibilidad de L-DOPA (Nagatsu y Sawada *et al.*, 2009). De esta manera L-DOPA restaura a la dopamina de la degeneración y muerte de neuronas, que reactivan las funciones motoras y se reducen los síntomas provocados por la enfermedad.

Posiblemente extractos de plantas de haba podrían sustituir a la L-DOPA sintética, que por ser de una fuente natural disminuye los efectos secundarios que causa la droga, además de que ayuda a retardar la progresión de la enfermedad (Patil *et al.*, 2013). Los contenidos de L-DOPA rondaron de 387 – 654 g Kg⁻¹ dependiendo de la variedad, cantidades que son muy promisorias para ser evaluadas en un ensayo *in vitro* o *in vivo* que confirme su efecto en la salud. Además, este compuesto presenta actividad antioxidante por lo que puede también ser utilizado en otro tipo de aplicaciones farmacológicas.

Cabe considerar que la suma de estos compuestos bioactivos encontrados en la planta de *V. faba*, pueden tener un efecto sinérgico que prevenga o sirva como tratamiento en enfermedades crónicas degenerativas, como podría ser en enfermos de Parkinson.

4.4 Conclusiones

Las plantas evaluadas de las variedades de haba Rojita, ICAMEX-V31, José María y Matlatzintla de veinte días después de la emergencia mostraron la presencia de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-DOPA, rutina e isoorientinas.

El perfil de flavonoides evidenció la presencia de rutina e isoorientinas que no habían sido detectados en la planta de *V. faba*.

La variedad Matlatzintla tuvo la mayor acumulación de CFT, FT e isoorientinas, mientras que la Rojita de rutina y L-DOPA.

La variedad José María presentó el mayor rendimiento estimado de biomasa y tuvo un alto potencial para acumular CFT, FT y L-DOPA por lo que podría ser propuesta para la extracción de estos metabolitos y considerar una producción masiva para su obtención.

Los extractos de la planta de haba mostraron actividad antioxidante y actividad anti-inflamatoria *in vitro*, efectos que son atribuidos a los compuestos L-DOPA y a rutina e isoorientinas, respectivamente. En donde la variedad Rojita presentó la mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria, por lo que cada variedad tiene su potencialidad

La planta de haba puede ser considerada una planta medicinal por los compuestos que contiene, los cuales tienen beneficios en la salud humana, para ello se necesitan realizar ensayos adicionales.

4.5 Literatura citada

- Akinyemi O., Oyewole S. O., Jimoh K. A. 2018. Medicinal plants and sustainable human health: a review. *Horticulture International Journal*. 2:194–195.
- Anilkumar K., G. V. Reddy, R. Azad, N. Sastry Yarla, G. Dharmapuri, A. Srivastava, M. A. Kamal, R. Pallu. 2017. Evaluation of Anti-Inflammatory Properties of Isoorientin Isolated from Tubers of *Pueraria tuberosa*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 5498054.
- Anoop M.V. y Bindu A. R. 2015. In-vitro Anti-inflammatory Activity Studies on *Syzygium zeylanicum* (L.) DC Leaves. *International Journal of Pharma Research & Review*. 4:18-27.
- Baroni L., Zuliana C. 2015. “A Plant-Food Diet in the Risk and Management of Parkinson’s Disease”. En: Ross W. R., Preedy V. R. *Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease*. USA: Academic Press.
- Barros L., M. Dueñas, A. M. Carvalho, I.C.F.R Ferreira, C. Santos-Buega. 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1576-1582.
- Boudjou S., Oomah B. D., Zaidi F., Hosseinian F. 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry*. 138:1543–1550.
- Boukhanouf S., H. Louaileche, D. Perrin. 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.
- Bumgarner N. R., Scheerens J. C., Kleinhenz M. D. 2012. Nutritional Yield: A Proposed Index for Fresh Food Improvement Illustrated with Leafy Vegetable Data. *Plant Foods for Human Nutrition*. 67:215–222.
- Clària J. 2001. Los nuevos antiinflamatorios. *Medicina Integral*. 38: 175-183.
- Etemadi F., Hashemi M., Shureshjani R. A., Autio W. R. 2017. Application of data envelopment analysis to assess performance efficiency of eight faba bean varieties. *Agronomic Application of Genetic Resources*. 109:1–7.
- Etemadi F., Hashemi M., Autio W. R., Mangan F. X., Zandvakili O. 2018a. Yield and Accumulation Trend of Biomass and L-DOPA in Different Parts of Eight Faba Bean Cultivars. *Crop Science*. 58: 2020–2028. doi: 10.2135/cropsci2018.03.0172.
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018b. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.12.001>
- Essa M.M., Braidly N., Bridge W., Subash S., Manivasagam T., Vijayan R.K., Al-Adawi S., Guillemain G. J. 2014. Review of natural products on Parkinson’s disease pathology. *Journal of Aging Research & Clinical Practice*. 32: 127-136.
- Fuentes-Herrera, P. B., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., Luna-Guevara, M. L., and Olvera-Hernández, J. I., 2020. Quantification of isoflavones in stems of faba bean (*Vicia faba* L.). *Rev FCA UNCUYO*, 52: 43-51.
- Gautam M., M. Chandel, W. Azmi. 2012. Therapeutic role of L-DOPA produced as a secondary metabolite from different legumes and plant sources. *Annals of Phytomedicine*. 1: 1-8.

- Ghorbani A. 2017. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96:305 -312.
- Gullón B., T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, G. Eibes. 2020. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*. 67: 2020 - 235.
- Ho Y. S., CH. D. Poon, T. F. Chan, R. C. C Chang. 2012. From small to big molecules: how do we prevent and delay the progression of age-related neurodegeneration? *Current Pharmaceutical Design*. 18: 15 – 26.
- Hao G., Y. Dong, R. Huo, K. Wen, Y. Zhang, G. Liang. 2016. Rutin Inhibits Neuroinflammation and Provides Neuroprotection in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage, Possibly Through Suppressing the RAGE–NF- κ B Inflammatory Signaling Pathway. *Neurochemical Research*. 41:1496–1504.
- Kaufman, P. B., Duke J. A., Brielmann, H., Boik, J., Hoyt, J. E., 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J Altern Complement Med*, 3: 7-12.
- Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Duke, J. A., Warber, S., Bolling, S., 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). *Evidence-Based Integrative Medicine*, 1: 131-135.
- Mizushima Y., Kobayashi M. 1968. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal Pharmacy Pharmacology*. 20: 169 -173.
- Nagatsu T., M. Sawada. 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. *Parkinsonism and Related Disorders*. 15: S3–S8.
- Okumura K., Hosoya T., Kawarazaki K., Izawa N., Kumazawa S. 2016. Antioxidant activity of phenolic compounds from fava bean sprouts. *Journal of Food Science*. 81: C1394 -C1398.
- Ortiz, L. M., Delgado, A. A., Herrera, C B. E., Arévalo, G. Ma. de L., Barrera, R. A. I., 2019. Efecto de dos métodos de secado en los compuestos fenólicos totales, L-DOPA y la actividad antioxidante de *Vicia faba* L. *Nova Scientia*, 11: 198-219.
- Patil S. A., O. A. Apine, S. N. Surwase, J. P. Jadhav. 2013. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. *Advances in Parkinson Diseases*. 2: 81-87.
- Polanowska, K., R. M. Łukasik, M. Kuligowski, J. Nowak. 2019. Development of a sustainable, simple, and robust method for efficient L-Dopa extraction. *Molecules*. 24: 2325.
- Rabey J. M., Vered Y., Shabtai H., Graff E., Korczyn A. D. 1992. Improvement of Parkinsonian features correlate with high plasma levodopa values after broad bean (*Vicia faba*) consumption. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 55:725-727.
- Rahmani-Nezhada S., S. Dianata, M. Saedia, M. B. Tehranic, A. Ghadirid, A. Hadjiakhoondia. 2018. Evaluating the accumulation trend of L-DOPA in dark-germinated seeds and suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. By an efficient UV-spectrophotometric method. 41: 386 – 393.
- Rhandir, R., Shetty, K., 2003. Light-mediated fava bean (*Vicia faba*) response to phytochemical and protein elicitors and consequences on nutraceutical enhancement and seed vigour. *Process Biochem*, 38: 945-952.
- Sakat S., Juvekar A., Gambhire M. N. 2010. *In vitro* antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1:146 – 155.

- Sharma S., A. Ali, J. Ali, J. K. Sahni, S. Baboota. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 22: 1063 – 1079.
- Siqueira-Soares, R. D. C., Soares, A. R., Valderrama, P. A., Ferrarese M. de L. L., & Ferrarese-Filho, O. (2013). Root growth and enzymes related to the lignification of maize seedlings exposed to the allelochemical L-DOPA. *The Scientific World Journal*, ID 134237, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/134237>.
- Soares A.R., R. Marchiosi, R.D. Siqueira-Soares, R. Barbosa de Lima, W. Dantas dos Santos, O. Ferrarese-Filho. 2014. The role of L-DOPA in plants. *Plant Signaling & Behavior*. e28275: 1-7.
- Sofowora A., Ogunbodede E., Onayade A. 2013. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 10: 210-229.
- Sulaiman C.T., I. Balachandran. 2012. Total Phenolics and Total Flavonoids in Selected Indian Medicinal Plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74:189 -280.
- Valente I. M., Cabrita A. R. J., Malushi N., Oliveira H. M., Papa L., Rodrigues J. A., Fonseca A. J.M., Maia M. R. G. 2019. Unravelling the phytonutrients and antioxidant properties of European *Vicia faba* L. seeds. *Food Research International*. 116: 888–896.
- Viveros-Antonio C. 2018. Análisis de fitoquímicos y actividad antioxidante de *Vanilla pompona* Schiede. Desarrollada bajo dos ambientes. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *Campus Puebla (COLPOS)*. 148 pp.
- Vered Y., J. M. Rabey, D. Palevitch, I. Grosskopf, A. Harsat, A. Yanowski, H. Shabtai, E. Graff. 1994. Bioavailability of Levodopa after Consumption of *Vicia faba* Seedlings by Parkinsonian Patients and Control Subjects. *Clinical Neuropharmacology*. 17: 138-146.
- Ziqubu K., P. V. Dlodla, E. Joubertd, C. J. F. Mullera, J. Louw, L. Tiano, B. B. Nkambule, A. P. Kappo, S. E. Mazibuko-Mbeje. 2020. Isoorientin: A dietary flavone with the potential to ameliorate diverse metabolic complications. *Pharmacological Research*. 158: 104867.

DISCUSIÓN GENERAL

El trabajo de investigación da un aporte importante al conocimiento científico con un enfoque interdisciplinario que ayuda a la acumulación de información y a nuevas perspectivas de investigación sobre *Vicia faba*, ya que con estos hallazgos se fortalece su uso y aplicación en el sector agrícola y en la salud.

En otros países el estudio de *V. faba* se ha enfocado en los compuestos bioactivos que presenta esta leguminosa, como es el metabolito L-DOPA. Marcus Guggenheim en 1913 aisló por primera vez el enantiomero levodopa (L-DOPA) de la planta de *V. faba* y posteriormente en los años 70s se comprobó que este compuesto es importante para tratar la enfermedad del Parkinson (Pezzoli *et al.*, 2011). Debido a que este compuesto restaura a la dopamina de la degeneración y muerte de neuronas dopaminérgicas asociadas a la enfermedad de Parkinson para la recuperación del sistema nervioso central (Florán-Garduño y Rangel-Baraja, 2005). El Parkinson es una enfermedad neuronal degenerativa que a nivel mundial afecta alrededor de 5 millones de personas mayores de 50 años y en México se estiman 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año (Gobierno de México, 2019).

En *V. faba* se ha demostrado que en los tejidos de la planta se encuentran contenidos de L-DOPA superiores a los presentados en el fruto, sin embargo, con variedades de haba mexicanas los estudios son escasos, además, que se desconoce que otro u otros tipos de compuestos bioactivos podrían proporcionar el tejido de la planta de haba. De esta manera no sólo el fruto podría ser aprovechado como alimento sino también la planta como una planta medicinal.

Con estos antecedentes, el planteamiento de este trabajo de investigación fue realizar un estudio con el apoyo de diferentes áreas y enfoques disciplinarios como la agronomía, bioquímica, fitoquímica, socio-economía con el propósito de abordar distintas problemáticas para encontrar soluciones interdisciplinarias, de tal forma que se puedan generar resultados estratégicos que sean de utilidad y tengan un posible impacto en el cultivo y producción del haba. Por lo que se estableció como objetivo general: “Conocer, cuantificar y obtener los rendimientos de los compuestos bioactivos; compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) e isoflavonas (daidzeína), encontrados en la planta de haba de variedades mexicanas, y evaluar la influencia que tienen algunos factores, como la condición de crecimiento y los métodos de procesamiento, en el contenido de estos fitoquímicos. Además de

estimar la rentabilidad de una innovación tecnológica para el cultivo de haba que podría aportarles a los productores”.

Para abordar la investigación trabajamos bajo la siguiente hipótesis general: los tejidos de la planta de haba de variedades mexicanas en estudio, bajo una condición de crecimiento y método de procesamiento, presentan concentraciones diferentes de compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados y utilizados por el ser humano como suplementos y/o productos funcionales. Además, con la producción de plántulas de haba los agricultores pueden tener una mayor rentabilidad que con la producción de haba verde. Para dar respuesta a esta hipótesis se realizaron cuatro objetivos específicos, uno en cada Capítulo de la investigación.

Con el primer objetivo se detectó que las condiciones de campo e invernadero en las que se desarrolló la planta de haba y el método de secado utilizado en los tejidos: liofilizado o estufa, influyeron en el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT). Se demostró que los contenidos en las plantas cosechadas en campo y procesadas con secado por estufa a 38°C presentaron los más altos contenidos de CFT y FT.

Además, que los contenidos de CFT y FT presentes en las plantas mostraron una tendencia decreciente constante de las plantas más jóvenes (10 días después de la emergencia, DDE) a las más adultas (20 DDE), independientemente de la condición de crecimiento y del método de procesamiento. En los brotes florales se encontró el contenido más alto de los metabolitos seguido de las flores abierta, plantas de 10, 15 y 20 DDE.

Con el segundo objetivo se demostró que los contenidos de CFT, FT, L-DOPA y daidzeína (DAID) de plantas y flores de cuatro variedades de haba mexicanas se ven influenciados por la condición en donde se desarrolla la planta; campo e invernadero. También se evidenció que las variables agroambientales evaluadas durante el crecimiento de las plantas tuvieron un efecto en los contenidos de los compuestos bioactivos, en donde principalmente la luminosidad tuvo una correlación positiva fuerte con DAID, mientras que temperatura y fósforo tuvieron una correlación inversa con DAID y L-DOPA. Todos los compuestos evaluados en las cuatro variedades de haba presentaron mayor contenido de estos metabolitos en las plantas cosechadas en campo. DAID se vio fuertemente afectada en las plantas sembradas en invernadero. Aunque las plantas a los 10 DDE presentaron contenidos mayores de CFT, FT y L-DOPA a diferencia de las plantas de 20 DDE. Al evaluar la cantidad de estos compuestos bioactivos presente por planta, se observó que,

a mayor acumulación de biomasa de la planta (20 DDE) la cantidad de estos compuestos bioactivos se incrementó. Por ejemplo, con la variedad José María en las plantas de 10 DDE el contenido de L-DOPA fue de 81.27 mg g⁻¹, y la cantidad por planta a los 10 DDE fue de 73.21 mg planta⁻¹, mientras que a los 20 DDE fue de 113.19 mg planta⁻¹.

En el tercer objetivo se evaluó económicamente la producción de plantas de 20 días después de la emergencia en campo e invernadero, como una innovación tecnológica para el cultivo de haba. Además, se hizo un análisis comparativo con la producción de haba verde. Se encontró que, la ganancia que perciben los productores por el cultivo de haba verde es mínima. El ingreso depende del mercado destino y la modalidad de venta. Los productores con 1 ha registraron una mayor ganancia privada con la venta de haba verde al menudeo (\$ 66, 153.33) y mayoreo (\$ 21, 153.33). Mientras que los productores de ¼ ha incurren en pérdidas cuando la venta es a mayoreo. Con base en los costos de producción de la superficie cultivada y la densidad de plantas, se obtuvo el precio estimado de venta de la planta, registrando una ganancia del 70%. La ganancia privada aumentó 104, 53 y 35% en ¼, ½ y 1 ha respectivamente, en relación a la venta a mayoreo de haba verde. Por lo que la innovación tecnológica del cultivo de planta de haba podría ser una alternativa para mejorar los ingresos de las familias productoras.

Con los resultados del cuarto objetivo se dio a conocer el rendimiento de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y L-DOPA en plantas de 20 DDE de cuatro variedades de haba. En donde la variedad José María presentó el mayor rendimiento de CFT (9.30 g m⁻²), FT (8.08 g m⁻²) y L-DOPA (5.64 g m⁻²). El perfil de flavonoides en los extractos del tejido de la planta evidenció la presencia de metabolitos como rutina e isoorientinas. La actividad antioxidante se destaca con la variedad Rojita (DPPH CI₅₀ = 87.68 µg mL⁻¹), al igual que la actividad anti-inflamatoria *in vitro* (CI₅₀ = 74.40 mg mL⁻¹), actividades que son atribuida a los compuestos L-DOPA y a rutina e isoorientinas, respectivamente.

En la investigación el estudio de estos metabolitos en la planta de *V. faba* se debió porque se ha demostrado que tienen actividad biológica que pueden generar un efecto potencialmente beneficioso en la salud. A continuación, se describe el efecto que podría tener los distintos compuestos bioactivos.

Compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT). Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes protegiendo a las células del estrés oxidativo con la eliminación de los

radicales libres por la donación de átomos de hidrógeno (Thirumurugan *et al.*, 2018). El término oxidación se refiere a procesos celulares internos que conllevan a la aparición de enfermedades, por lo que el estrés oxidativo tiene incidencia en enfermedades principalmente cardiovasculares, pero también en la aparición de cáncer y en enfermedades neurodegenerativas. Así que la importancia de los alimentos radica no solo en su valor nutrimental, sino también en los antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo (Coronado *et al.*, 2015).

El efecto benéfico en la salud por los compuestos fenólicos en parte es generado por los flavonoides, al respecto se ha documentado que además de tener actividad antioxidante, también tienen efecto protector como antiapoptótico, anticancerígeno, antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano (Magalingam *et al.*, 2015), antihipertensivo, quimiopreventivo y antidiabético (Turco *et al.*, 2016). Así que los flavonoides por su acción biológica benéfica en la salud humana merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales, para consumir el valor promedio de 23 mg al día de la ingesta de flavonoides (Escamilla *et al.*, 2009).

Se ha demostrado con pruebas *in vivo* que los flavonoides como naringenina y quercetina, pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Youdim *et al.*, 2004), y tener un efecto de protección en las neuronas. En la revisión de Magalingam *et al.* (2015) mencionan literatura actual sobre los diversos mecanismos que tienen los flavonoides como neuroprotectores para ayudar a retrasar la pérdida de células neuronales en la enfermedad de Parkinson. Ya que de manera intracelular; 1) activan el funcionamiento de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa), 2) algunos flavonoides pueden inhibir la oxidación lipídica en células neuronales, 3) se consideran como agentes terapéuticos para aminorar la neuroinflamación y atenuar los mediadores proapoptóticos, 4) reparan el defecto de transporte de electrones mitocondrial, siendo esta una de las disfunciones en los procesos fisiológicos de las mitocondrias que pueden conducir a aparición de enfermedades relacionadas con la edad, como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer.

Como las plantas y las flores de haba han mostrado tener contenidos altos de compuestos fenólicos entre estos flavonoides y L-DOPA, el consumo de estos tejidos por los pacientes con Parkinson podría aportar un tratamiento más completo o mejor que el fármaco, primero porque suministraría L-DOPA que es el precursor principal para la producción de dopamina al cerebro (Nagatsu y Sawada, 2009; Soares *et al.*, 2014) y segundo por el efecto neuroprotector que tienen los

flavonoides (Magalingam *et al.*, 2015). Ambos efectos indispensables para los enfermos con Parkinson.

L-DOPA. La enfermedad de Parkinson afecta a alrededor del 1 % de la población mayor de 50 años (Zuber, 2002). Se caracteriza por ser una enfermedad neuronal degenerativa que es causada por un desequilibrio de dopamina y acetilcolina en el estriado del cerebro. Ese desequilibrio es debido a la degeneración de las células que producen dopamina, provocando la alteración de neurotransmisores que controlan los movimientos, la memoria, la inteligencia, estado de ánimo, el sueño, la digestión y el apetito (Randhir *et al.*, 2002). Con base en la revisión realizada por Nagatsu y Sawada (2009) señalan que la L-DOPA puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, para que en las neuronas dopaminérgicas sea sintetizada la dopamina, por la acción de la enzima L-aminoácido descarboxilasa aromático (dopa descarboxilasa), el primer neurotransmisor de la catecolamina entre los tres existentes; dopamina, noradrenalina y adrenalina (Gautam *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014). En la actualidad L-DOPA sigue siendo la piedra angular (Patil *et al.*, 2013) o el estándar de oro (Nagatsu y Sawada, 2009) en el tratamiento de Parkinson, y *V. faba* es una fuente biológica para la producción de L-DOPA que puede ser utilizada como una alternativa en lugar de los fármacos sintetizados químicamente. La administración de L-DOPA en enfermos con Parkinson varía dependiendo del avance de la enfermedad, no de la edad por lo que se les suele ingerir los pacientes de 300 – 600 mg al día de L-DOPA (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1 Requerimientos de dosis de L-DOPA en pacientes con Parkinson.

| | Paciente | | | | | | |
|--|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Género | M | M | M | F | M | M | M |
| Edad (años) | 85 | 69 | 62 | 52 | 48 | 40 | 56 |
| Dosis de L-DOPA (mg día⁻¹) | 300 | 400 | 300 | 475 | 600 | 300 | 500 |

M; masculino, F; femenino. Elaboración propia con información documentada de Apaydin *et al.* (2000) y Cassani *et al.* (2016).

Los rendimientos que obtuvimos de L-DOPA en plantas de 20 días después de la emergencia estuvieron en un rango de 100 – 130 mg planta⁻¹, independientemente de la condición de crecimiento (campo e invernadero) y de la variedad de haba (Rojita, ICAMEX, José María, Matlatzintla). Tomando como referencia estos resultados se podría sugerir a un paciente con Parkinson, que como tratamiento se le administra una dosis de 300 mg de L-DOPA al día (Cuadro 5.1), para lo cual tendría que consumir aproximadamente 5.58 g de polvo de planta de haba durante el día, lo equivalente a 3 plantas secas de 20 DDE. Al respecto se ha demostrado que el consumo de L-DOPA proveniente de plantas de haba (40 g de plantas frescas) incrementan los niveles de L-DOPA en el plasma de pacientes con la enfermedad de Parkinson, que muestran mejorías en sus características motoras, similares a lo que se obtiene cuando el paciente consume el medicamento (Vered *et al.*, 1994). Así que, con base en los resultados obtenidos de la investigación, y con el conocimiento de que el contenido de L-DOPA en plantas de haba puede ser importante para el control del Parkinson, se puede proponer a *V. faba* como materia prima para la elaboración de un nutracéutico.

Daidzeína. Entre los flavonoides que contiene el haba se encuentran las isoflavonas, las cuales se clasifican como los compuestos de mayor actividad estrogénica (Křížová *et al.*, 2019). Su actividad estrogénica se debe a que son moléculas con una gran similitud estructural con el estrógeno 17- β estradiol, por lo que es considerado un fitoestrógeno (Anderson *et al.*, 1999; López, 2010). López (2010) menciona que de acuerdo a la Agencia de Normas Alimentarias (Food Standards Agency), los fitoestrógenos son compuestos biológicamente activos que se producen de forma natural en los vegetales, que induce respuesta biológica y que puede mimetizar o modular las acciones de los estrógenos endógenos. Debido a esta acción estrogénica, las isoflavonas juegan un papel importante en la mejora de los síntomas hipoestrogénicos de la menopausia, por lo que son consideradas como una alternativa a las hormonas para atenuar los adversos efectos secundarios del climaterio (Anderson *et al.*, 1999; López, 2010; Křížová *et al.*, 2019). Además, por su efecto estrogénico agonista o antagonista en diferentes tejidos, estos metabolitos también pueden estar implicados en la prevención de enfermedades cardiovasculares, en la salud ósea y en cierto tipo de cáncer (mama, colorrectal, próstata), Lutz (2011), Anderson *et al.* (1999) y Křížová *et al.*, 2019 lo documentan ampliamente.

Entre las isoflavonas, se encuentran las agliconas (las cuales son moléculas que no se encuentran conjugadas por azúcares, sino que están de manera libre) genisteína, daidzeína, biochanina A y formononetina, por su actividad estrogénica han sido mayormente investigadas (Mazur y Adlercreutz, 1998). Siendo en la soya (*Glycine max*) o en alimentos a base de soya (Wang y Murphy, 1994; Shao *et al.*, 2011) en donde se encuentran en cantidades altas, además, los seres humanos obtienen de esta leguminosa la mayor ingesta de fitoestrógenos (Anderson *et al.*, 1999; Lutz, 2011). Sin embargo, en otras especies como en *V. faba* también se pueden encontrar isoflavonas, particularmente daidzeína en los tejidos de la planta de haba (Kaufman *et al.*, 1994; Fuentes-Herrera *et al.*, 2020). La actividad biológica de daidzeína es menor que sus metabolitos derivados (Muthyala *et al.*, 2004). Cuando daidzeína se ingiere, mediante la acción enzimática de las bacterias intestinales se transforma en metabolitos como son en 6,7,4'- trihidroxisoflavona (Yong-Hyun *et al.*, 2018) e equol (Muthyala *et al.*, 2004; Mayo *et al.*, 2019), ambos con diferentes actividades farmacológicas (Figura 5.1). En el caso de 6, 7, 4'- trihidroxisoflavona se ha comprobado en pruebas in vivo con ratones que este metabolito mejoró la disfunción cognitiva inducida por escopolamina, además de que mejoró el aprendizaje y el rendimiento de la memoria mediante la activación del sistema colinérgico y la vía de señalización de la unión del elemento de respuesta al cAMP de fósforo / el factor neurotrófico derivado del cerebro en ratones (Yong-Hyun *et al.*, 2018). Mientras que equol ha demostrado tener un efecto aparente en el cáncer de mama. Muthyala *et al.* (2004) en su estudio evalúan la formación de equol enantiómero (R-equol y S-equol) de su precursor (daidzeína), además de la actividad de los enantiómeros sobre dos estrógenos receptores ER α y ER β , mencionando que esta molécula podría tener un uso benéfico en el cáncer de mama.

Aunque las semillas de soya son una fuente natural de fitoestrógenos con contenidos de daidzina 24.64 mg g⁻¹, genistina 56.32 mg g⁻¹, daidzeína 1.70 mg g⁻¹ y genisteína 2.26 mg g⁻¹ (Huang y Liu, 2012). En los resultados de nuestro trabajo sobre el contenido de daidzeína en plantas de variedades de haba, se obtuvieron valores en campo en un rango de daidzeína de 0.35 a 0.69 mg g⁻¹ MS, y en invernadero de 0.070 a 0.100 mg g⁻¹ MS. Mientras que en las flores cosechadas en campo los valores fueron de 0.34 – 0.51 mg g⁻¹ MS. A pesar de que los contenidos son menores a los presentados en soya, son superiores a los encontrados en semillas de leguminosas como haba (3.4 μ g g⁻¹ MS), lenteja verde (5 μ g kg⁻¹ peso húmedo (PH)), en frijol rojo (8,3 μ g kg⁻¹ PH) y en garbanzos (9,3 μ g kg⁻¹ PH) (Konar *et al.*, 2012). Así que, aunque a la fecha los tejidos de la planta

de haba no se utilizan para consumo humano, podrían ser aprovechados para la extracción de daidzeína y proveer de fitoestrógenos.

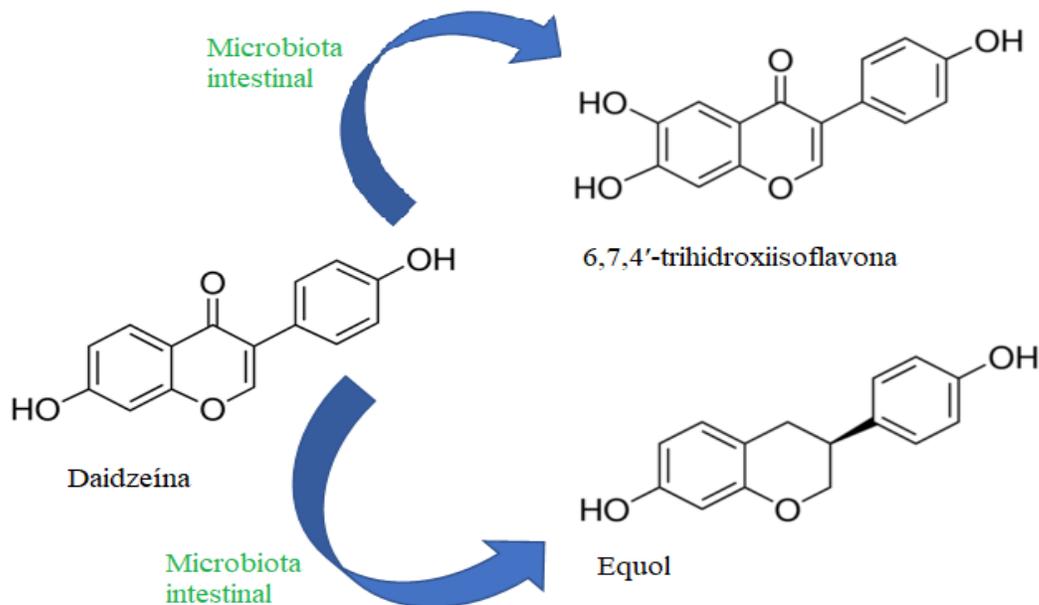


Figura 5.1 Metabolitos derivados de daidzeína con actividad farmacológica. Elaboración propia con información recabada de Muthyala *et al.* (2004) y Yong-Hyun *et al.* (2018).

Con base en los resultados de la investigación, la planta o tejidos de la planta de *V. faba* podrían ser aprovechados por los compuestos bioactivos que contiene. En el estudio los contenidos encontrados de CB en la planta o en la flor de haba, fueron superiores a los obtenidos en el grano de haba por otros autores. Por ejemplo, de flavonoides totales en la flor se obtuvo hasta 1500 veces más que en el grano de haba, o bien de L-DOPA se obtuvo 473 veces más en planta que, en grano de haba. De daidzeína se pueden llegar a encontrar 132 veces más contenido en la flor que en el grano (Cuadro 5.2). Por lo que se recomienda que estos tejidos deberían ser aprovechados para la obtención de CB y utilizarlos para proveer salud al consumidor.

Cuadro 5.2 Compuestos bioactivos (CB) presentes en tejidos de la planta de *Vicia faba*.

| CB PP | Planta | | Flor | | Grano | Referencia |
|---|--------|----------|--------|------------|----------------------------|------------------------------------|
| CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | 107.64 | 2-3x | 162.01 | 4-5x | 30.93 – 42.44 [†] | Boudjou <i>et al.</i> (2013) |
| FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | 89.87 | 635-809x | 165.74 | 1178-1500x | 0.11 – 0.14 | Boudjou <i>et al.</i> (2013) |
| L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | 71.05 | 61-473x | 92.13 | 80-614x | 0.15 – 1.15 | Polanowska <i>et al.</i> (2019) |
| Daidzeína (mg g ⁻¹ MS) | 0.3 | 88x | 0.45 | 132x | ND – 0.0034 | Kirakosyan <i>et al.</i> (2004) |

[†] Se evaluó con quercetina en lugar de ác. gálico (mg EQ g⁻¹ MS). CB; Compuestos bioactivos, PP; Partes de la planta, CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales, ND; valor no detectado.

Entre los CB evaluados en el estudio, L-DOPA ha sido uno de los fitoquímico de mayor interés en la investigación por el efecto terapéutico que tiene para los enfermos de Parkinson, además de que en los tejidos de la planta del haba se pueden encontrar altos contenidos de este metabolito que pudiera considerarse una fuente natural para los pacientes. Con la descripción de estudios realizados por diferentes investigadores se destaca la importancia de L-DOPA proveniente de *V. faba*. Tal como se ha explorado en los ejes embrionarios de las plantas de haba, que se consideran como una buena fuente natural de L-DOPA por contener cantidades altas (dependiendo de la variedad hasta 84.39 mg g⁻¹ MS) (Goyoaga *et al.*, 2008). Aunque en el estudio no se consideró el rendimiento por eje embrionario, si reportan en un gráfico su peso en materia seca, el cual fue menor de 0.2 g aproximadamente, lo que podría equivaler a un rendimiento aproximado de 16.87 mg de L-DOPA por eje embrionario. En tanto que, en esta investigación el peso obtenido de una planta de 20 DDE es alrededor de 1.63 g MS y su rendimiento fue de 108.31 mg de L-DOPA por planta; y por 30 flores de haba se tuvo un peso medio de alrededor de 0.73 g MS con un rendimiento de 68.37 mg de L-DOPA por 30 flores (ambos tejidos independientemente de la variedad utilizada) (Cuadro 5.3). Por lo que ambos rendimientos fueron superiores a lo que se puede obtener con los ejes embrionarios de haba.

Cuadro 5.3 Valores medios de peso en materia seca y rendimientos de compuestos bioactivos de tejidos de haba obtenidos en condiciones de crecimiento de campo.

| | Tejido | Peso (g) | Rendimiento | | | |
|--------|----------------------|----------|-------------|---------|---------|-------|
| | | | CFT | FT | L-DOPA | DAD |
| Planta | 10 DDE [†] | 0.799 | 104.185 | 80.344 | 67.148 | 0.389 |
| | 15 DDE [†] | 1.025 | 112.861 | 115.536 | 76.953 | 0.515 |
| | 20 DDE [†] | 1.638 | 146.802 | 141.354 | 108.318 | 0.833 |
| | Flores ^{††} | 0.738 | 120.125 | 122.783 | 68.372 | 0.338 |

CFT: compuestos fenólicos totales, FT: flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4-dehidroxifenilalanina, DAD: daidzeína. † mg por planta de haba. †† mg por 30 flores de haba.

Mucuna pruriens es una especie de leguminosa que crece espontáneamente en zonas tropicales y subtropicales en el mundo como en gran parte de África y Sudamérica, aunque no es consumida comúnmente por el hombre por contener antinutrientes (Cassani *et al.*, 2016). En áreas rurales como la India, Filipinas, Nigeria, Ghana, Brasil y Malawi si se utiliza como alimento (Pugalenthi y Vadivel, 2007). De acuerdo a la revisión realizada por Pugalenthi y Vadivel (2007) mencionan que entre las plantas que contienen L-DOPA, la planta de *Mucuna pruriens* tiene la cantidad suficiente para utilizar el compuesto con fines medicinales, en donde las semillas presentan los contenidos más altos con alrededor de 4.93 – 5.39 %, mientras que en otros tejidos de la planta los contenidos son bajos: de 0.17 – 0.35 % en las hojas, de 0.19 - 0.31 % en los tallos y de 0.12 - 0.16 % en las raíces. En pacientes con Parkinson, Cassani *et al.* (2016) confirmaron que el consumo de semillas de *Mucuna pruriens* generó una mejora en los síntomas motores junto con una mayor duración en ON (activo) y reducidas discinesias. Sin embargo, a pesar de su efectividad como compuesto natural para los enfermos de Parkinson, la obtención de semillas de *Mucuna pruriens* tarda un periodo de alrededor de entre ocho y nueve meses (Pool *et al.*, 1998), que es un tiempo prolongado a diferencia de los tejidos de la planta de haba, donde las plantas tardan alrededor de un mes desde su siembra y las flores aproximadamente tres meses. Además, *Mucuna pruriens* es una semilla que no se consume comúnmente por los compuestos antinutricionales que contiene, entre otros, los oligosacáridos (verbascos, estaquiosa, rafinosa) (Kamatchi y Ramasamy, 2010) que pueden provocar flatulencias, interferencia en la absorción de nutrientes en el intestino

(Martínez-Villanueva *et al.*, 2008), inflamación y malestares estomacales (Tahir *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque los antinutrientes como los oligosacáridos pueden ser reducidos con ciertos métodos de procesamiento como el remojo de las semillas con solución de NaHCO₃ (0.2 %) y cocción en autoclave a (121 °C, 30 min), L-DOPA también se ve afectado por el procesamiento, con una disminución en su contenido entre 69 – 83 % (Vadivel y Pugalenthí, 2008). Hecho que igualmente lo refieren en otro trabajo, donde confirman que el procesamiento con el remojo y cocción de los granos de *Mucuna pruriens*, provoca la reducción del contenido de L-DOPA hasta 70 % (Cassani *et al.*, 2016).

Así que los tejidos de la planta de *V. faba* pueden posicionarse como una fuente natural alternativa para la obtención de L-DOPA, que a diferencia de *Mucuna pruriens*, presentan contenidos superiores a los que se acumulan en sus semillas (Cuadro 5.4). Algunos autores también han documentado en *V. faba* las cantidades de L-DOPA en varios tejidos como en la raíz, eje embrionario, planta y flores, y muchos de ellos son superiores (Cuadro 5.4) a los presentados en las semillas secas de *Mucuna pruriens* (5.29 %) (Cassani *et al.*, 2016). Además, en las plantas de haba no hay presencia de antinutrientes como los oligosacáridos, puesto que ningún paciente comentó que el consumir plantas frescas de haba le provocó flatulencias o algún otro malestar (Vered *et al.*, 1994).

Cassani *et al.* (2016) en su trabajo proponen el suministro de L-DOPA por medio de semillas de *Mucuna pruriens* para los enfermos de Parkinson, fundamentalmente para pacientes de escasos recursos que difícilmente pueden obtener el medicamento y que viven en lugares en donde se puede cultivar la leguminosa. *Vicia faba* es cultivada en México, principalmente en los estados que integran la mesa central del país como son Puebla, Tlaxcala (Rojas-Tiempo, 2012) y Edo. México (Pérez *et al.*, 2015), y en varios lugares del mundo (Figura 5.2) por lo que esta especie también podría ser utilizada con un enfoque similar.

V. faba como opción natural para la obtención de L-DOPA y otros compuestos bioactivos, se recomienda utilizar plantas de 20 DDE crecidas en campo, por ser el material vegetal que resultó tener los rendimientos más altos de CB (Figura 5.3). Además, desde su siembra hasta su recolección el tiempo aproximado de obtención es de entre 25 – 35 días (un mes), de acuerdo a las labores agronómicas sus requerimientos son mínimos, además de que se puede cultivar durante todo el año y por el período tan corto que se necesita para el desarrollo de la planta de haba,

Cuadro 5.4 Rangos del contenido de L-DOPA encontrados en tejidos de la planta de haba.

| Tejido | | L-DOPA (mg g⁻¹ de MS) | Porcentaje (%)[†] | Referencia |
|-----------------|--|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Raíz | Raíces de plantas de 3 a 9 días | 90 | 9 | Oviedo-Silva <i>et al.</i> (2018) |
| | Raíces de plantas de 95 días después de la germinación (valores obtenidos en materia fresca) | aproximadamente 7 | 0.70 | Etemadi <i>et al.</i> (2018) |
| Eje embrionario | Al sexto día de la germinación | 74.60 - 84.39 | 7.46 - 8.43 | Goyoaga <i>et al.</i> (2008) |
| | | 10.50 | 1.05 | Etemadi <i>et al.</i> (2018) |
| Hojas | Hojas de plantas de 95 días después de la germinación (valores obtenidos en materia fresca) | 18.20 - 48.70 | 1.82 - 4.87 | Hu <i>et al.</i> (2015) |
| | Brotos de 8-9 días | 126 | 13 | Oviedo-Silva <i>et al.</i> (2018) |
| Planta | 15 días después de la germinación (valores obtenidos en materia fresca) | 13.3 | 1.33 | Etemadi <i>et al.</i> (2018) |
| | 10 - 12 días de crecidas | 8.29 - 40.01 | 0.829 - 4 | Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) |
| Flores | día 9 después de la emergencia | 30 - 50 | 3 - 5 | Vered <i>et al.</i> (1994) |
| | Flores de diferentes tonalidades | 27.80 - 63.50 | 2.78 - 6.35 | Hu <i>et al.</i> (2015) |
| Semillas | | 0 - 2.02 | 0 - 0.202 | Kirakosyan <i>et al.</i> (2014) |

[†] Porcentajes evaluados propiamente con los contenidos obtenidos de las referencias.

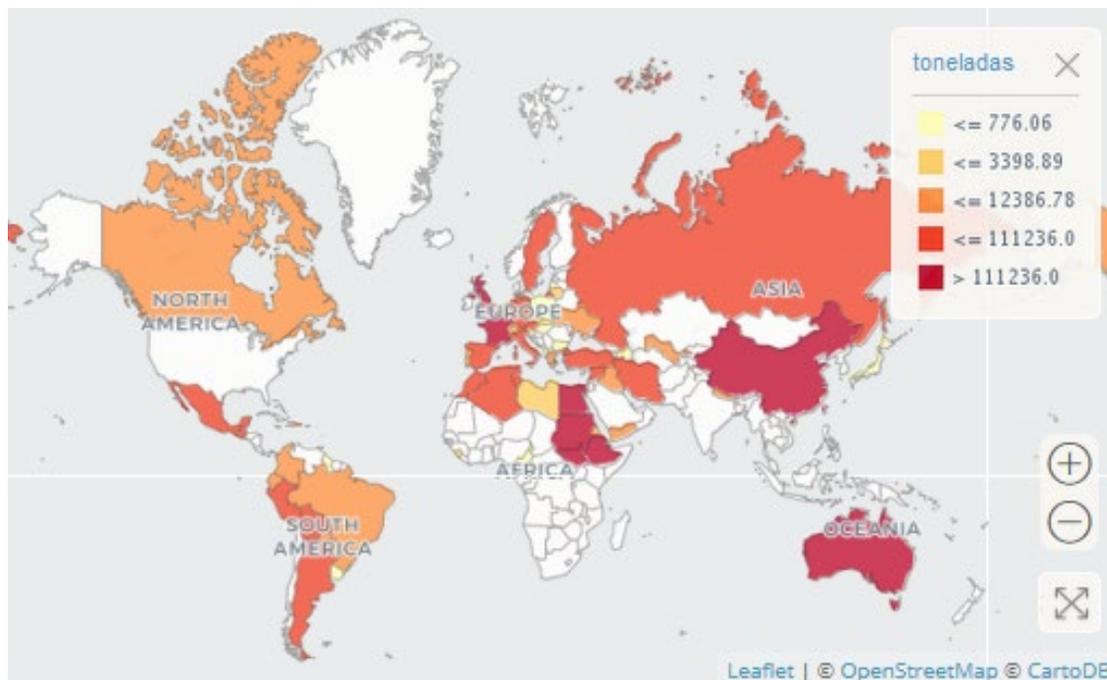


Figura 5.2 Cantidades de producción de haba común y haba caballar secas por país en el periodo de 2000-2017 (FAOSTAT, 2019).

ambientalmente la contaminación es mínima. Los resultados sobre el procesamiento de las muestras evidencian que el secado por estufa a 38 °C es un buen método de conservación para los tejidos y para los metabolitos. Además, que el secado por estufa genera un costo menor de procesamiento a diferencia del que se tiene con el liofilizado. La posibilidad de obtener L-DOPA de las plantas de haba en un periodo corto y que no contengan oligosacáridos, crea una gran ventaja de uso respecto a *Mucuna pruriens* para que sea utilizada como fuente de este fitoquímico. Además, en esta investigación se demostró que también en las plantas podemos encontrar compuestos fenólicos, flavonoides, daídzeína, rutina e isoorientinas, los cuales podrían coadyuvar al efecto benéfico de la L-DOPA en el tratamiento del mal de Parkinson. Al igual se dio a conocer los rendimientos que se podrían obtener de las variedades de haba mexicanas y se dio a conocer los costos de producción de las plantas de haba y las ganancias que podrían percibir los productores. Esta investigación e información conllevan al comienzo de una estrategia para el aprovechamiento de *Vicia faba* L. en la obtención de compuestos bioactivos, como una alternativa en el desarrollo agrícola.

Compuestos bioactivos

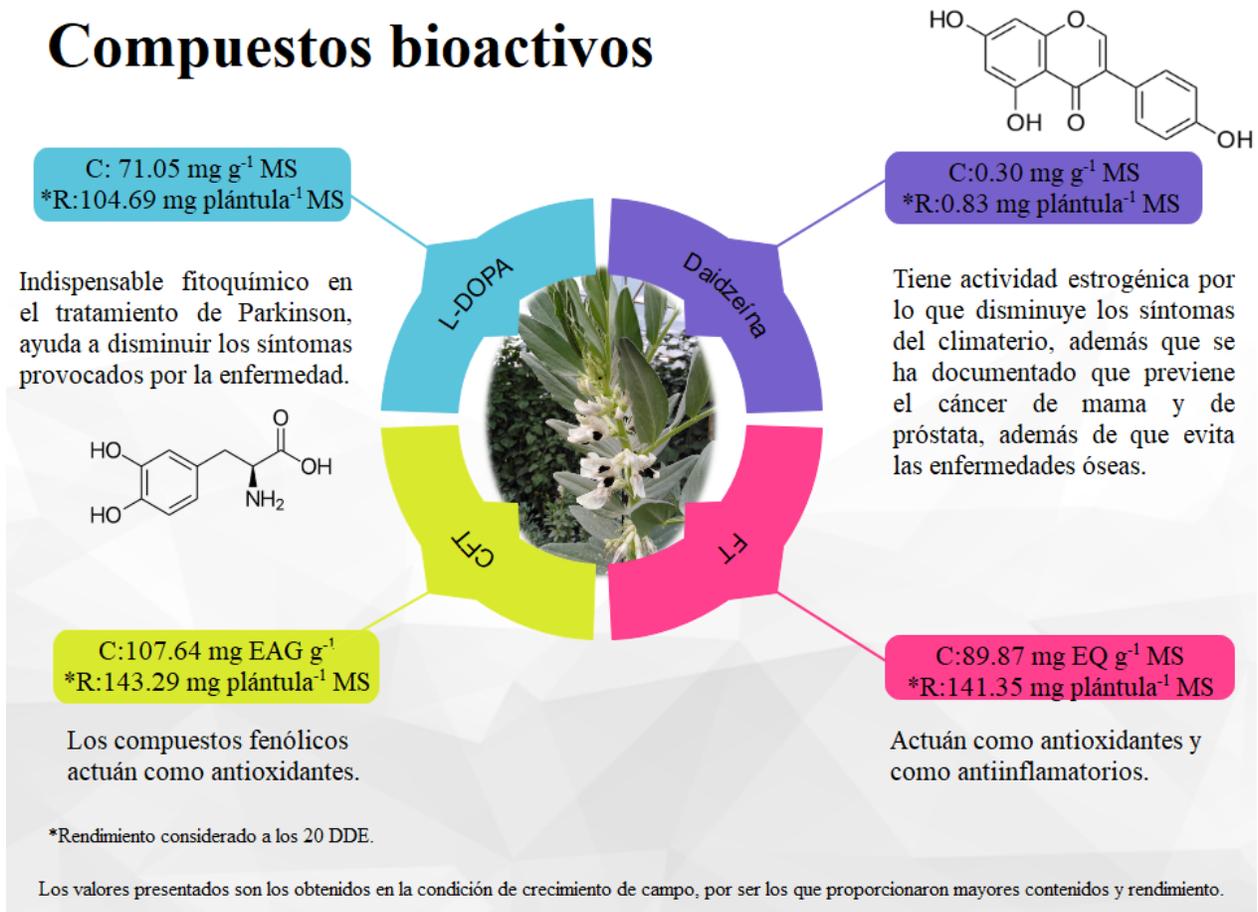


Figura 5.3 Contenido y rendimiento promedio de compuestos bioactivos encontrados en las plantas de cuatro variedades de *Vicia faba*, que pueden ser aprovechados y utilizados por su efecto beneficioso en la salud. Compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), L-3,4-dehidroxifenilalanina (L-DOPA) y daidzeína.

La investigación desarrollada tiene un impacto agrícola a largo plazo, principalmente en los municipios en donde se produce el haba y/o en otros que se quisiera adaptar el cultivo. La aplicación de esta nueva innovación tecnológica podría impulsar la agricultura y a su vez la economía en los municipios productores de México, en donde se cultiva el haba y/o en otras zonas en donde se quisiera adaptar, ya sea bajo sistema de producción en campo o invernadero. Además de que impulsaría a los agricultores a seguir sembrando el haba, dado que implica un riesgo alto el establecer el cultivo para la obtención de grano (7-9 meses) por la presencia de plagas y/o enfermedades. Cabe resaltar que la producción de L-DOPA y la producción de los otros fitoquímicos se obtienen en ciclos muy cortos de cultivo de aproximadamente un mes. Así que

esta alternativa se podría considerar para mantener la economía en las zonas en donde se produce el cultivo de haba.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos de la investigación permitieron dar respuestas al problema de investigación, por lo que se establecen las siguientes conclusiones:

Las variedades de haba mexicanas Rojita, ICAMEX-V31, José María y Matlatzintla tienen contenidos de fitoquímicos importantes para ser aprovechadas para la obtención de compuestos bioactivos. Las variedades de floración tardía proporcionan mayor contenido de ciertos metabolitos como CFT, FT y L-DOPA y tienen una acumulación mayor de biomasa. Mientras que las variedades de floración temprana sintetizan mayor cantidad de daidzeína pero presentan una acumulación menor de biomasa.

Entre los tejidos de la planta, las flores presentaron una acumulación mayor de compuestos bioactivos (CFT, FT, L-DOPA y daidzeína). Sin embargo, las plantas tienen un periodo de desarrollo más corto para su obtención, además de contar con otras ventajas como mayor contenido de biomasa, menor consumo de insumos para su producción, entre otras, que las destaca como material vegetal idóneo para su aprovechamiento.

Bajo las condiciones de crecimiento de campo los tejidos de la planta de haba acumularon los contenidos más altos de compuestos bioactivos. Sin embargo, bajo condiciones de invernadero también podría ser considerado para una producción masiva, además de que se controlan las variables medioambientales y de calidad física y microbiológica.

Se comprobó que un factor importante para la acumulación de fitoquímicos es la intensidad luminosa que recibe la planta, principalmente para ciertos metabolitos, como fue el caso de daidzeína que se vio fuertemente afectada, cuando la densidad de flujo de fotones fotosintética fue menor. La temperatura también tuvo un efecto en la acumulación de compuestos bioactivos, en donde se observa que con un incremento de la temperatura la síntesis de L-DOPA y daidzeína se ven afectada negativamente.

Los rendimientos de los compuestos bioactivos obtenidos de las plantas de variedades de haba fueron importantes para evaluarlas y considerar una producción masiva para su obtención y posible utilización como productos naturales en el tratamiento o prevención de enfermedades crónicas.

El perfil de flavonoides en los extractos de la planta de haba evidencio la presencia de rutina e isoorientinas que no habían sido detectados y descritos en estos tejidos.

El análisis de actividad biológica *in vitro* de los extractos de las plantas de haba, demostró que los compuestos bioactivos presentes en el tejido tienen actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria. A L-DOPA se le atribuyó el efecto antioxidante, mientras que a rutina e isoorientinas se les atribuyó el efecto antiinflamatorio.

El análisis económico de la producción de planta de haba y el análisis comparativo de la producción de haba verde, dio a conocer los costos de producción y la rentabilidad que el haba verde les genera a los productores, y lo que el cultivo de plantas de haba les podría proporcionar bajo los sistemas de producción de campo e invernadero. La innovación tecnológica es una alternativa para mejorar los ingresos de las familias productoras.

PERSPECTIVAS Y ALCANCES DE LA INVESTIGACION

Los resultados de la investigación de este trabajo además de aportar información y conocimiento básico sobre *V. faba* importante han abierto nuevas perspectivas, por lo que se plantean algunas recomendaciones que pueden ser retomadas en trabajos posteriores:

- Evaluar la **conservación** de los compuestos bioactivos, mediante el tiempo de almacenamiento bajo distintos empaques (plástico, papel) o envasados (al vacío), para conocer el tiempo que los metabolitos puedan mantenerse en la matriz, sin que sus contenidos tengan una reducción significativa.
- Realizar **pruebas de actividad biológica** *in vitro* (células humanas y de mamíferos) e *in vivo* (con animales y personas) para confirmar su efecto en la salud.
- Evaluar con técnicas de **nutrigenómica** los mecanismos por los cuales los fitoquímicos previenen o tratan a las enfermedades crónico-degenerativos.

- Elaborar un producto como **suplemento alimenticio** que se pueda presentar en forma farmacéutica como comprimidos (tabletas, pastillas), capsulas, emulsión, suspensión, jarabe y/o polvo.
- Realizar un **estudio de mercado** y un **estudio de valoración económica** para estimar la disposición a pagar del consumidor, a fin de evaluar la factibilidad que podría tener la aplicación de la innovación tecnológica en el cultivo de haba.
- Implementar y evaluar otras **técnicas agrícolas** para producir planta de haba como el acolchado, o con agricultura protegida como macro túneles y micro túneles, para evaluar la producción y calidad del material vegetal.
- Evaluar con productores de haba en distintas localidades del estado de Puebla o del país la **producción, calidad física y fitoquímica** de las plantas, para valorar la implementación de la innovación tecnológica en otros lugares y bajo otras condiciones en el territorio mexicano.

5.3 Literatura citada

- Anderson J. J. B., M. S. Antony. 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutrition* 2: 489-504.
- Apaydin H., S. Ertan, S. Özekmekçi. 2000. Broad Bean (*Vicia faba*)—A Natural Source of L-Dopa—Prolongs “On” Periods in Patients with Parkinson’s Disease Who Have “On-Off” Fluctuations. *Movement Disorder Society* 15: 163-179.
- Cassani E., R. Cilia, J. Laguna, M. Barichella, M. Contin, E. Cereda, Ioannis U. I., F. Sparvoli, A. Akpalu, K. Ofosu B, M. T. Scarpa, G. Pezzoli. 2016. *Mucuna pruriens* for Parkinson’s disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. *Journal of the Neurological Sciences*. 365: 175–180.
- Coronado H. M., S. Vega, L.R. Gutiérrez T., M. Vázquez F., C. Radilla V. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de nutrición*. 42: 2006-2012.
- Escamilla J. C. I., E. Y. Cuevas M., J. Guevara F. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Monografía. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 52: 73-75.
- Etemadi F., M. Hashemi, R. Randhir, O. Zand V., A. Ebadi. 2018b. Accumulation of L-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on L-DOPA yield. *The Crop Journal*, CJ-00270: 2214-5141.
- Florán-Garduño B., C. Rangel-Barajas. 2005. Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Revisión Biomedica*. 16:273-280.

- Fuentes-Herrera P.B., A. Delgado-Alvarado, B. E. Herrera-Cabrera, M. L. Luna-Guevara, J. I. Olvera-Hernández. 2020. Quantification of isoflavones in stems of faba bean (*Vicia faba* L.). Rev FCA UNCUYO. 52: 43-51.
- Gautam M., M. Chandel, W. Azmi. 2012. Therapeutic role of L-DOPA produced as a secondary metabolite from different legumes and plant sources. Annals of Phytomedicine. 1: 1-8.
- Gobierno de México. 2019. Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es> (Consultada el 6 de octubre de 2020).
- Goyoaga C., C. Burbano, C. Cuadrado, A. Varela, E- Guillamón, M. M. Pedrosa, M. Muzquiz. 2008. Content and distribution of vicine, convicine and L-DOPA during germination and seedling growth of two *Vicia faba* L. varieties. European Food Research and Technology. 227:1537-1542.
- Hu J., S. J. Kwon, J. J. Park, E. Landry, D. S. Mattinson, D. R. Gang. 2015. LC-MS determination of L-DOPA concentration in the leaf and flower tissues of six faba bean (*Vicia faba* L.) lines with common and rare flower colors. Functional Foods in Health and Disease. 5(7): 243-250.
- Huang M., D. Liu. 2012. Thin Layer Chromatography Densitometric Determination of Soybean Isoflavones in Wild Soybean (*Glycine soja*) Seeds. Asian Journal of Chemistry. 24: 1322-1324.
- Kaufman, P. B., Duke J. A., Briellmann, H., Boik, J., Hoyt, J. E., 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. J Altern Complement Med, 3: 7-12.
- Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Duke, J. A., Warber, S., Bolling, S., 2004. The production of L-dopa and isoflavones in seeds and seedlings of different cultivars of *Vicia faba* L. (faba bean). Evidence-Based Integrative Medicine, 1: 131-135.
- Kondrasheva I. G., Gambaryan, E.S. Severin, A.A. Guseva, A.A. Kamensky. 2013. The application of L-DOPA-containing polymeric nanoparticles provides motor function recovery in 6-OHDA-induced Parkinson's disease model. Movement Disorders. 333: e65-e108.
- Kamatchi K. B., Ramasamy V. M. 2010. Nutritional and anti-nutritional potential of three accessions of itching bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC var. pruriens): an under-utilized tribal pulse. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 61: 497–511.
- Křížová L., K. Dadáková, J. Kašparovská and T. Kašparovský. 2019. Isoflavones. Molecules 24: 1-28.
- López L. M. T. 2010. Fitoestrógenos. Eficacia y seguridad. Ámbito farmacéutico. Fitoterapia (OFFARM). 29: 86 – 90.
- Lutz M. 2011. Soy isoflavones as bioactive ingredients of functional foods. En: Hany El-Shemy. Soybean and Health (Ed.). In Tech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/soy-isoflavones-as-bioactive-ingredients-of-functionalfoods>

- Magalingam K. B., A. K. Radhakrishnan, N. Haleagrahara. 2015. Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 314560: 1-14.
- Martínez-Villaluenga C., J. Frias, C. Vidal-Valverde. 2008. Alpha-Galactosides: Antinutritional Factor or Functional Ingredients? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 301-316.
- Mayo B., L. Vázquez, A. B. Flórez. 2019. Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients*. 11: 2231.
- Mazur W., H. Adlercreutz. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure & Applied Chemistry*. 70: 1759-1776.
- Multari S., D. Stewart, W. R. Russell. 2015. Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 511 -522.
- Muthyala R. S., Y. H. Ju, S. Sheng, L. D. Williams, D. R. Doerge, B. S. Katzenellenbogen, W. G. Helferich, J. A. Katzenellenbogen. 2004. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of *R*- and *S*-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10: 1559 – 1567.
- Nagatsu T., M. Sawada. 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. *Parkinsonism and Related Disorders*. 15: S3–S8.
- Nur Y. E., E. Sönmez, M. Savaşan S., T. Çakır, I. Aksan K. 2018. Validation of an in-vitro Parkinson's disease model for the study of neuroprotection. *Proceedings*. 2, 1559.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/STAT). 2019. Base de datos estadísticas. Comparar Datos. Balances de alimentarios. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#compare> (Consultado el 30 de marzo de 2020).
- Oviedo-Silva C. A., Elso-Freudenberg M., Aranda-Bustos M. 2018. L-DOPA Trends in Different Tissues at Early Stages of *Vicia faba* Growth: Effect of Tyrosine Treatment. *Applied Sciences*. 8, 2431.
- Patil S. A., O. A. Apine, S. N. Surwase, J. P. Jadhav. 2013. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. *Advances in Parkinson Diseases*. 2: 81-87.
- Pezzoli, G., Zini, M. and Amrein, R. 2011. L-DOPA: the drug that changed the history of parkinson's disease. *Focus on Parkinson's Disease* 22:7-11.
- Pérez L. D. de J., A. González H., M. Rubí A., O. Franco M., J. R. P. Franco M., A. Padilla L. 2015. Análisis de 35 cultivares de haba por su producción de vaina verde y otros componentes del rendimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6:1601-1613.
- Polanowska K., R. M. Łukasik, M. Kuligowski, J. Nowak. 2019. Development of a sustainable, simple, and robust method for efficient L-DOPA Extraction. *Molecules*. 24: 2325.
- Pool N. L., N. S. León M., C. González S. P. Figueroa F. 1998. Frijol terciopelo, cultivo de cobertura en la agricultura chol del valle del Tulija, Chiapas, Mexico. 16:359-369.

- Pugalenthi M., V. Vadivel. 2007. L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine): A Non-Protein Toxic Amino Acid in *Mucuna pruriens* Seeds. Global Science Books. 1: 322 – 343.
- Randhir R., P. Shetty, K. Shetty. 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*. 37:1247–1256.
- Rojas-Tiempo J., Díaz-Ruiz R., Álvarez-Gaxiola F., Ocampo-Mendoza J. y Escalante-Estrada A. 2012. Tecnología de producción de haba y características socioeconómicas de productores en Puebla y Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(1): 35-49.
- Shao S., A. M. Duncan, R. Yang, M. F. Marcone, I. Rajcan, R. Tsao. 2011. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. *Food Research International* 44: 2425 – 2434.
- Sherer T. B., R. Betarbet, A. K., Stout, S., Lund, M. Baptista, A. V. Panov, M. R. Cookson, J. Timothy Greenamyre. 2002. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and Oxidative damage. *The Journal of Neuroscience*. 22: 7006–7015.
- Tahir, M., N. Lindeboom, M. Baga, A. Vandenberg, R. N. Chibbar. 2011. Composition and correlation between major seed constituents in selected lentil (*Lens culinaris*. Medik) genotypes. *Canadian Journals of Plant Science*. 91: 825-835.
- Thirumurugan D., A. Cholarajan, S.S.S. Raja, R. Vijayakumar. 2018. Introductory Chapter: Secondary Metabolites. Chapter 1. En R. Vijayakumar and S.S.S. Raja. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. IntechOpen. 3-21 pp.
- Vadivel V., M. Pugalenthi. 2008. Effect of various processing methods on the levels of antinutritional constituents and protein digestibility of *Mucuna pruriens* (L.) dc. var. Utilis (wall. ex wight) baker ex burck (velvet bean) sedes. *Journal of Food Biochemistry*. 32: 795–812.
- Vered Y., J. M. Rabey, D. Palevitch, I. Grosskopf, A. Harsat, A. Yanowski, H. Shabtai, E. Graff. 1994. Bioavailability of Levodopa after Consumption of *Vicia faba* Seedlings by Parkinsonian Patients and Control Subjects. *Clinical Neuropharmacology*. 17: 138-146.
- Wang H., P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 42: 1666-1673.
- Yong-Hyun K., K. Sun Y. L. Seok-Young, J. Choon-Gon. 2018. 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone, a major metabolite of daidzein, improves learning and memory via the cholinergic system and the p-CREB/BDNF signaling pathway in mice. *European Journal of Pharmacology* 826: 140 – 147.
- Youdim K. A., M. Zeeshan Q., D. J. Begley, C. A. Rice-Evans, N. J. Abbot. 2004. Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*. 36: 592-604.
- Zuber M. 2002. Enfermedad de Parkinson. *Enciclopedia Práctica de Medicina*. 5-0950: 1-5.

ANEXOS

Anexos 1A

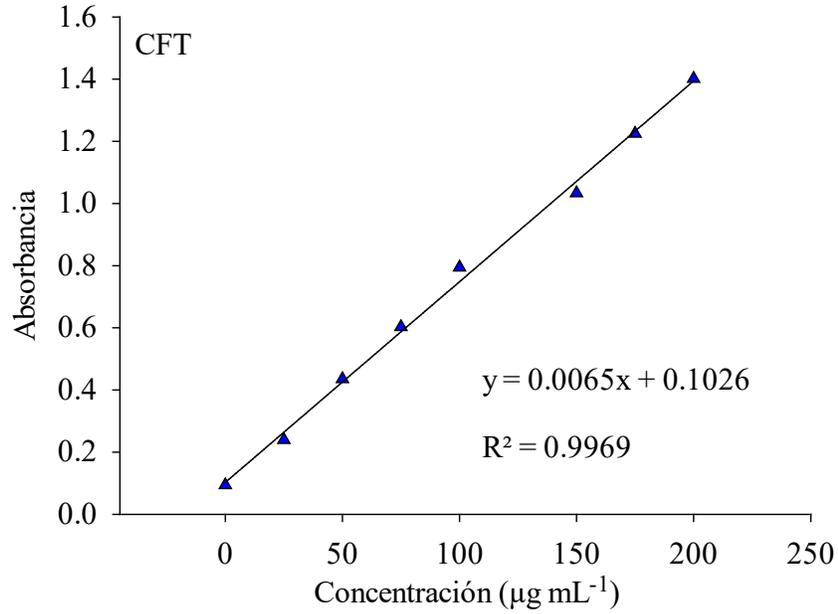


Figura 1.1A Curva de calibración de compuestos fenólicos totales.

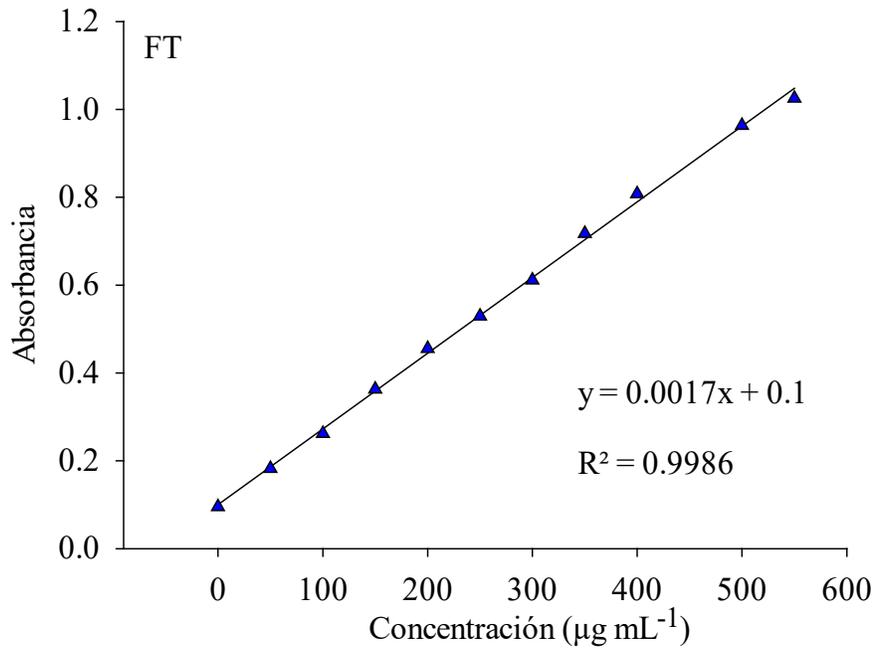


Figura 1.2 A Curva de calibración de flavonoides totales.

Cuadro 1.1A Análisis de varianza de los solventes de extracción para compuestos fenólicos.

| VAR | MEDIA | CV (%) | CM ERROR |
|------------------------------------|---------|--------|----------|
| CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | 96.84** | 8.15 | 31623.83 |
| FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | 97.41** | 12.45 | 15699.45 |

VAR; Variable, CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales, CV; Coeficiente de variación; CM; Cuadrado medio.

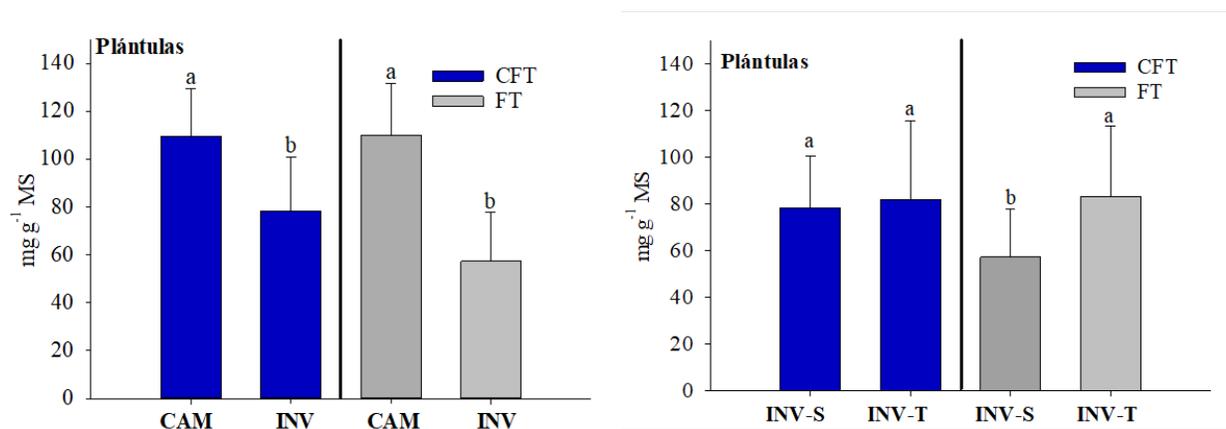


Figura 1.3A Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, mg EAG g⁻¹ MS) y flavonoides totales (FT, mg EQ g⁻¹ MS) en plantas de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; *campo* (CAM), *invernadero-suelo* (INV-S), *invernadero-tezontle* (INV-T). Medias con letras distintas por condición de crecimiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 24$).

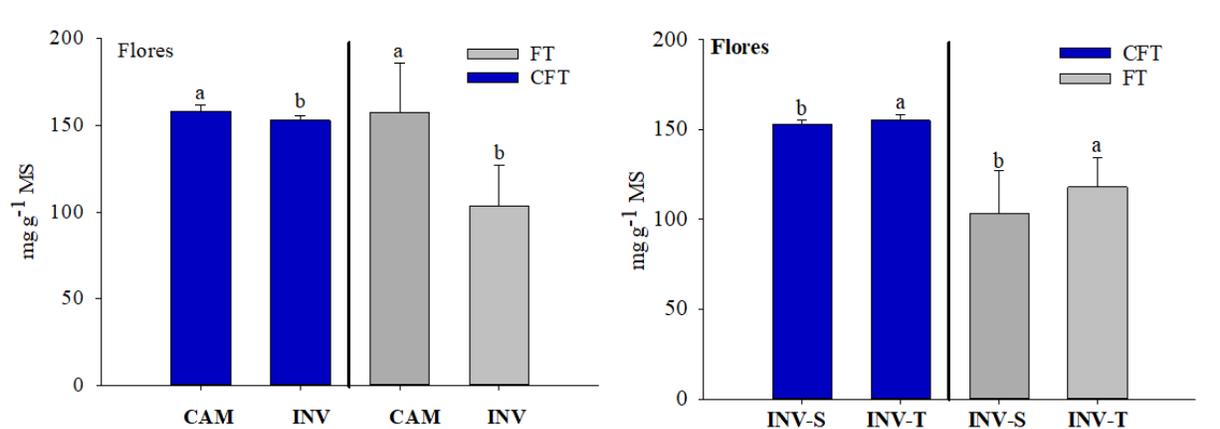


Figura 1.4A Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, mg EAG g⁻¹ MS) y flavonoides totales (FT, mg EQ g⁻¹ MS) en flores de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM), invernadero-suelo (INV-S), invernadero-tezontle (INV-T). Medias con letras distintas por condición de crecimiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 16$).

Cuadro 1.2A Temperatura (°C) promedio por mes durante la siembra y desarrollo de *Vicia faba* L. en dos condiciones distintas de crecimiento

| | | †CAMPO | | | ††INVERNADERO | | |
|------|-----|--------|--------|-------|---------------|-------|------|
| | | MED | MAX | MIN | MED | MAX | MIN |
| 2017 | SEP | 18.64 | 24.56 | 12.72 | – | – | – |
| | OCT | 17.45 | 24.34 | 10.57 | 17.54 | 33.08 | 9.38 |
| | NOV | 15.71 | 25.077 | 6.34 | 16.04 | 38.11 | 6.19 |
| | DIC | 13.87 | 23.7 | 4.05 | 14.94 | 33.4 | 5.12 |
| 2018 | ENE | – | – | – | 13.72 | 31.07 | 4.23 |

MAX: máxima, MIN: mínima. Información obtenida de: †CONAGUA (2019) y con un †† registrador datalogger (HOBO, H08-004-02).

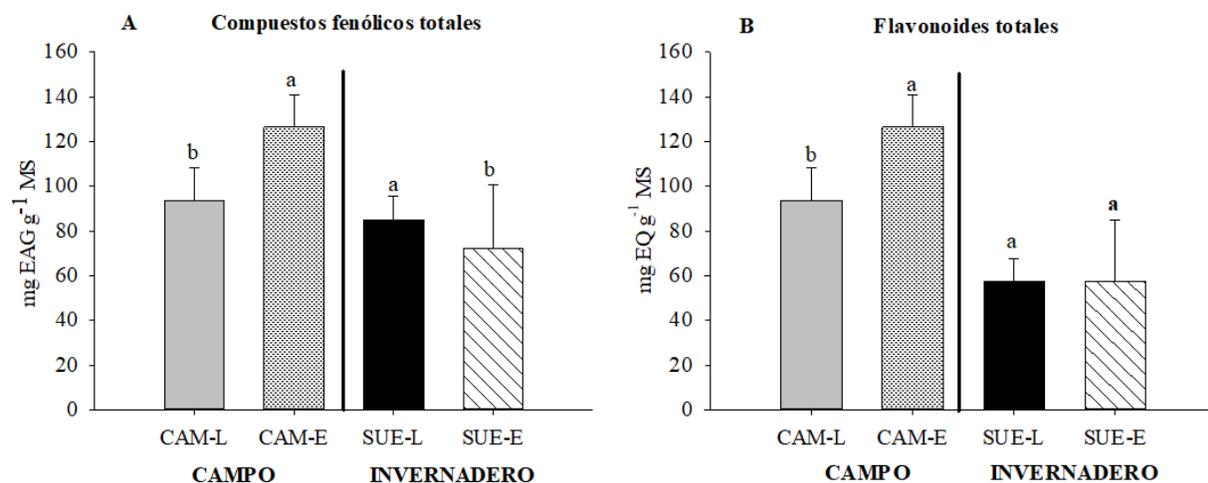


Figura 1.5A Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; *campo* e *invernadero*, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por condición de crecimiento y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 24$).

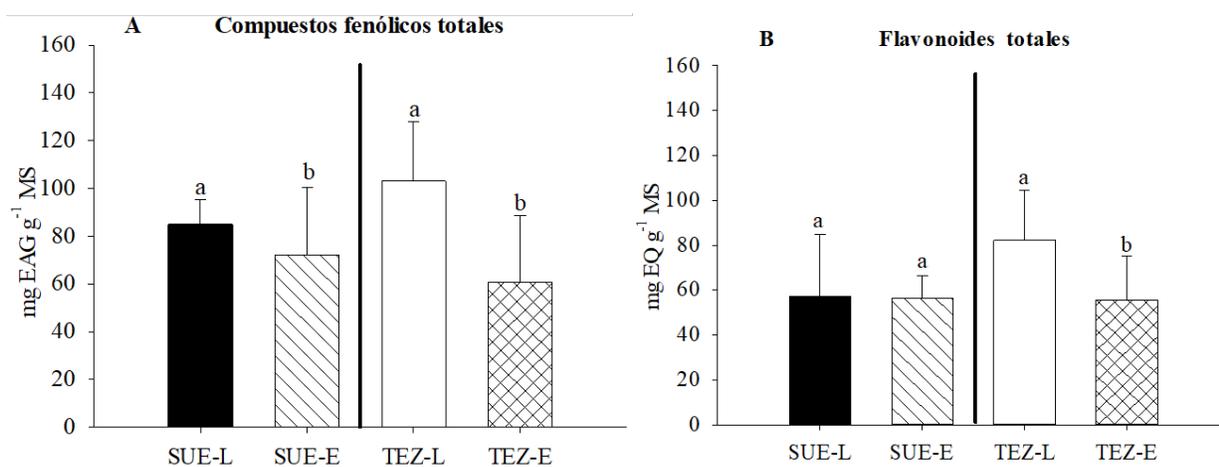


Figura 1.6A Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en plantas de *Vicia faba* L. de diferentes días de emergencia (DDE), bajo condiciones distintas de crecimiento; *invernadero-suelo* e *invernadero-tezontle*, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 24$).

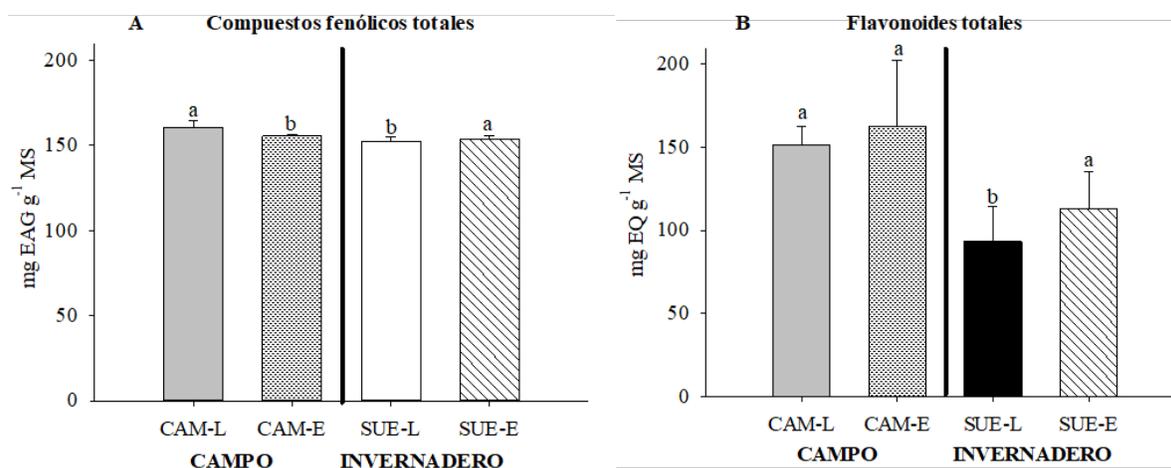


Figura 1.7A Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; *campo* e *invernadero*, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por condición de crecimiento y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 16$).

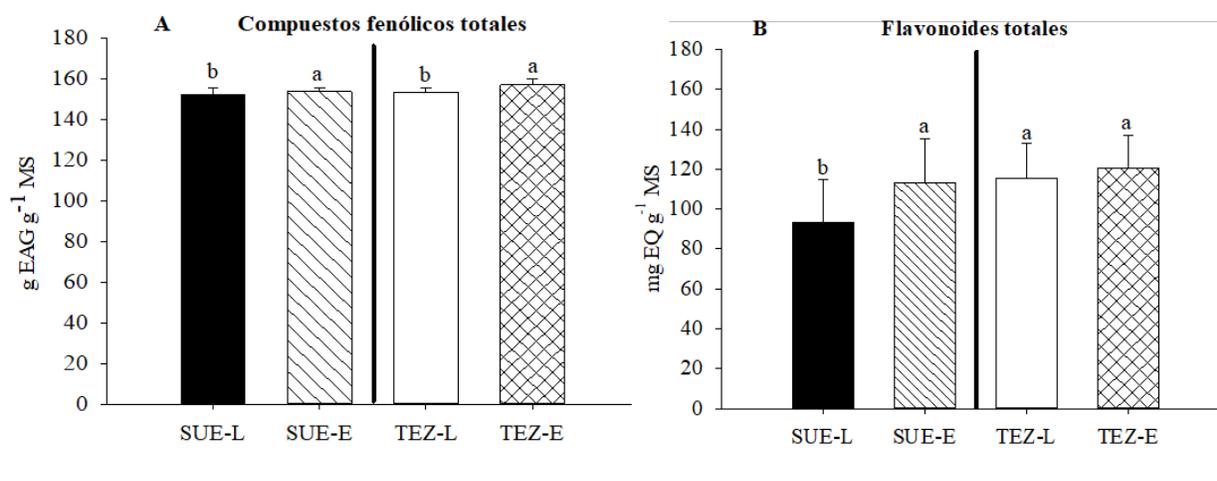


Figura 1.8A Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides totales (B) en flores de *Vicia faba* L. en condiciones distintas de crecimiento; *invernadero-suelo* e *invernadero-tezontle*, y métodos de procesamiento; liofilizado (L) y estufa (E). Medias con letras distintas por condición de crecimiento y método de procesamiento son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 16$).

Anexos 2A

Cuadro 2.1A Características del suelo en *Campo* e *Invernadero* utilizado para la siembra de *Vicia faba* L.

| Características | CAMPO | | INVERNADERO | |
|------------------------------|-------|---------------------------------------|-------------|------------------------|
| | Valor | Interpretación | Valor | Interpretación |
| pH | 7.10 | Neutro | 8.58 | Fuertemente alcalino |
| CE (ds/m) | 0.18 | Efectos despreciables de la salinidad | 1.74 | Muy ligeramente salino |
| MO (%) | 0.75 | Bajo | 1.90 | Medio |
| P (mg kg ⁻¹) | 62.00 | Alto | 103 | Alto |
| N (%) | 0.06 | Muy bajo | 0.37 | Muy Alto |
| Arena (%) | 91.64 | | 35.00 | |
| Arcilla (%) | 5.08 | | 38.00 | |
| Limo (%) | 3.28 | | 27.00 | |
| Textura | | Arena migajosa | | Franco Arcillosa |
| CIC (cmol kg ⁻¹) | 7.00 | Bajo | 10.40 | Bajo |
| K (cmol kg ⁻¹) | 0.28 | Bajo | 50.00 | Alto |
| Na (cmol kg ⁻¹) | 0.34 | | – | |
| Ca (cmol kg ⁻¹) | 3.75 | Bajo | 82.00 | Alto |
| Mg (cmol kg ⁻¹) | 1.75 | Medio | 16.00 | Alto |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 60.00 | Muy alto | 22.30 | Alto |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 1.28 | Adecuado | 1.99 | Adecuado |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 1.18 | Adecuado | 5.51 | Adecuado |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 2.30 | Adecuado | 8.12 | Muy alto |

CIC; capacidad de intercambio catiónico, MO; materia orgánica, CE; conductividad eléctrica. La interpretación de los resultados fue de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

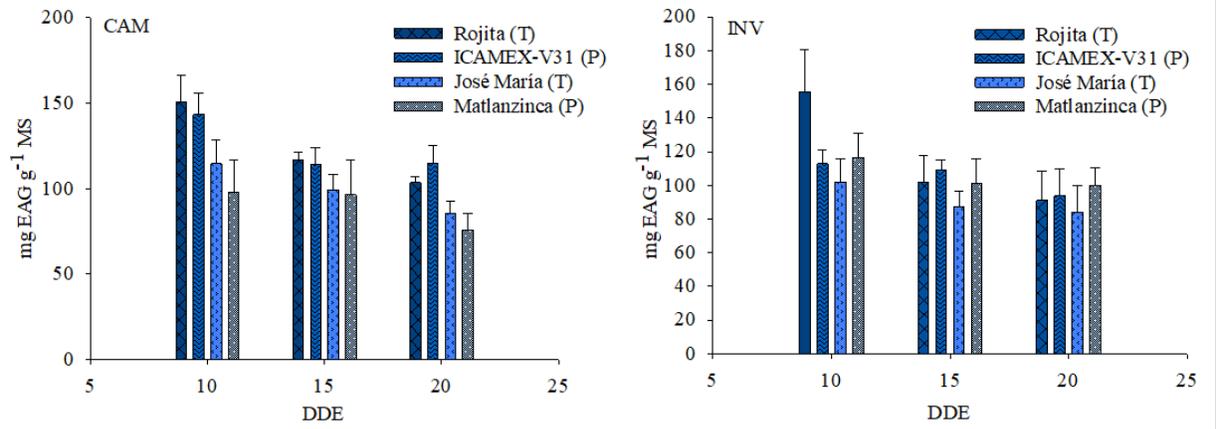


Figura 2.1A Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). DDE; días después de la emergencia, T; Tardía, P; Precoz. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 9$).

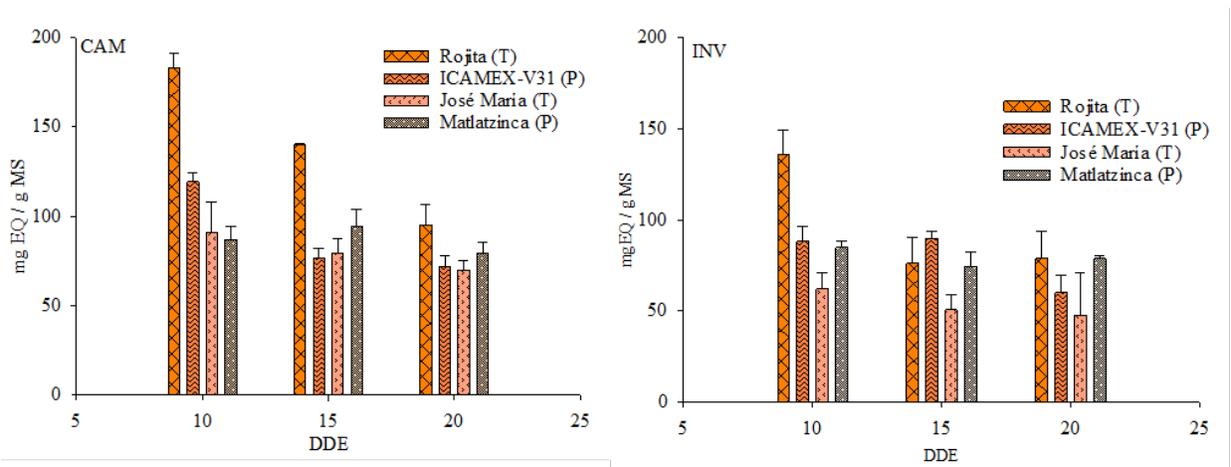


Figura 2.2A Contenido de flavonoides totales (FT) en plantas de cuatro variedades de *Vicia faba* L. bajo condiciones distintas de crecimiento; campo (CAM) e invernadero (INV). DDE; días después de la emergencia, T; Tardía, P; Precoz. Las barras indican \pm desviación estándar ($n = 9$).

Cuadro 2.4A Análisis de varianza de rendimientos de compuestos bioactivos en flores de haba sembradas en condiciones de campo.

| Variable | Media | CV (%) | CUADRADOS MEDIOS | | R ² |
|---|----------|--------|------------------|-------------|----------------|
| | | | VAR | PREC | |
| CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | 120.12** | 10.60 | 1137.5340** | 1274.3566** | 0.80 |
| FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | 122.78** | 7.04 | 1084.0191** | 471.4525** | 0.87 |
| L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | 68.37** | 8.50 | 385.8100** | 429.3612** | 0.87 |
| DAID (mg g ⁻¹ MS) | 0.33** | 7.84 | 0.0093** | 0.0114** | 0.88 |

CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales; L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAID; Daidzeína, CV; Coeficiente de variación, VAR; Variedad, PREC; Precocidad, NS; No significancia, * $p < 0.05$; Diferencias significativas, ** $p < 0.01$; Diferencias altamente significativas.

Cuadro 2.5A Comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) de rendimientos de compuestos bioactivos en flores de *Vicia faba* L.

| | | CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | DAID (mg g ⁻¹ MS) |
|-------------|--------------|--|--|--|--|
| | Rojita | 141.57a | 145.86a | 81.01a | 0.356 ^a |
| | ICAMEX-V31 | 125.06ab | 129.95ab | 71.16 ^a | 0.3853 ^a |
| VAR | José María | 119.29ab | 112.23bc | 67.69ab | 0.2569b |
| | Matlatzintla | 94.58b | 103.07c | 53.62b | 0.352 ^a |
| PREC | P | 109.82b | 116.51b | 74.35a | 0.306b |
| | T | 130.43a | 129.05a | 62.39b | 0.3683 ^a |

VAR; Variedad, PREC; Precocidad, P; Precoz, T; tardía, CFT; Compuestos fenólicos totales, FT; Flavonoides totales; L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina, DAD; Daidzeína. Medias con la misma letra por columna, no son significativamente diferentes.

2.6A Análisis de Redundancia

El cálculo de redundancia de los valores teóricos (dependientes e independientes) de la primera función canónica, muestra que el valor teórico criterio es importante (0.649), mientras que el valor teórico predictor muestra un índice de redundancia menor (0.290). Sin embargo no causa algún inconveniente ya que existe una clara explicación entre las variables dependientes e independientes (Cuadro 2.6 A). Mientras que la función canónica dos presentó que los índices de redundancia para los valores teóricos fueron menores con 0.018 para el valor teórico dependiente y 0.188 para el valor teórico independiente (Cuadro 2.6 A). Por lo que la primera función canónica explica significativamente una gran parte de la varianza a diferencia de la segunda función.

Cuadro 2.6A Cálculo de índices de redundancia para la primera y segunda función canónica.

| Variables | Carga canónica | Carga elevada al cuadrado | Carga media elevada al cuadrado | r ² | IR | Carga canónica | Carga elevada al cuadrado | Carga media elevada al cuadrado | r ² | IR |
|---------------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------------|----------------|-------|------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------|-------|
| <i>Primera función</i> | | | | | | <i>Segunda función</i> | | | | |
| Variables independientes | | | | | | | | | | |
| Tem | -0.9963 | 0.9926 | | | | -0.0061 | 0.0000 | | | |
| HR | 0.3877 | 0.1503 | 0.745 | 0.871 | 0.649 | -0.0192 | 0.0003 | 0.030 | 0.595 | 0.018 |
| PPFD | 0.9580 | 0.9177 | | | | 0.2491 | 0.0620 | | | |
| P | -0.9583 | 0.9183 | | | | -0.2444 | 0.0597 | | | |
| Variables dependientes | | | | | | | | | | |
| CFT | 0.2479 | 0.0614 | | | | -0.5805 | 0.3369 | | | |
| FT | 0.3961 | 0.1568 | 0.332 | 0.871 | 0.290 | -0.2384 | 0.0568 | 0.316 | 0.595 | 0.188 |
| LDOPA | 0.5401 | 0.2917 | | | | -0.8392 | 0.7042 | | | |
| DAD | 0.9066 | 0.8219 | | | | 0.4064 | 0.1651 | | | |

IR: índice de redundancia, Tem: temperatura, HR: humedad relativa, PPFD: Densidad de Flujo de fotones, P. fósforo, CFT: compuestos fenólicos totales, FT; flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4 dehidroxifenilalanina, DAD: daidzeína.

2.7A Cargas cruzadas canónicas

El cuadro 2.7A presenta las cargas cruzadas para las dos funciones canónicas, en donde se aprecia que en la función 1 las variables dependientes L-DOPA (0.5041) y DAD (0.8462), presentan altas correlaciones con el valor teórico independiente. En donde el porcentaje de la varianza explicada por la función 1 es de 25.41 % y 71.60 % para L-DOPA y DAID, respectivamente. Mientras que

las cargas cruzadas de las variables independientes, presentan que las variables Tem (-0.9298), PPFD (0.8941) y P (-0.8944) tienen altas correlaciones con el valor teórico canónico criterio. Así que el porcentaje de la varianza explicada por el valor teórico criterio es de 86.45, 79.94 y 79.99 % de Tem, PPFD y P, respectivamente. Los signos de las cargas cruzadas muestran que PPFD tiene una relación directa con DAD, mientras que TEM y P tiene una relación inversa con L-DOPA (Cuadro 2.7A).

Cuadro 2.7A Cargas canónicas cruzadas entre las variables agroambientales y de suelo y los compuestos bioactivos encontrados en plantas de *Vicia faba* L.

| | Función 1 | Función 2 |
|---|------------------|------------------|
| Correlaciones entre las variables independientes y sus valores teóricos canónicos dependientes | | |
| Tem | -0.9298 | -0.0047 |
| HR | 0.3619 | -0.0148 |
| PPFD | 0.8941 | 0.1922 |
| P | -0.8944 | -0.1886 |
| Correlaciones entre las variables dependientes y sus valores teóricos canónicos independientes | | |
| CFT | 0.2313 | -0.4479 |
| FT | 0.3697 | -0.1839 |
| LDOPA | 0.5041 | -0.6475 |
| DAID | 0.8462 | 0.3136 |

Tem: temperatura, HR: humedad relativa, PPFD: Densidad de Flujo de fotones fotosintéticos, P. fósforo, CFT: compuestos fenólicos totales, FT; flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4 dehidroxifenilalanina, DAID: daidzeína.

Anexos 3.1A



GUÍA: LABORES Y COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE HABA VERDE

La presente entrevista tiene como objetivo conocer el costo y la rentabilidad de la producción plantas de haba y haba verde en campo y en invernadero. La información recabada será confidencial y empleada para fines de la investigación sin afectar su persona.

DATOS PERSONALES

Nombre: _____

Edad: _____

Municipio/Localidad: _____ Fecha de entrevista: _____

Principal ocupación _____

Escolaridad: Preescolar Primaria Secundaria Bachillerato Licenciatura

Otros: _____

Tipo de propiedad: a) propiedad social: ejido o comunidad agraria b) propiedad privada

¿Cuántos integrantes son en su familia? Mujeres _____ Hombres _____

CONOCIMIENTO DEL CULTIVO DE HABA

1. ¿Cuántos años lleva cultivando el haba?

- a) 5 – 10 años b) 10 – 20 años c) 20 – 30 años d) más de 30 años e) toda la vida

2. ¿Lo siembra en campo o en invernadero?

- a) Campo b) Invernadero c) Ambos

3. ¿Cuántas variedades de haba siembra?

- a) Una b) Dos c) Tres d) Más de tres ¿Cuántas? _____

4. ¿Cómo conoce a su variedad de haba?

- Blanca Morada Criolla Amarilla Tarragona Parraleña
 Mestiza Cochinera

Otra _____

5. ¿Cómo son las características del haba que siembran (características físicas)?

- Tamaño de grano a) pequeño b) mediano c) grande

Color de la testa (Cáscara) _____

Color del grano (Cotiledón) _____

6. ¿Su haba tiene floración precoz o tardía?

- a) Precoz (floración se tiene entre los 35 – 55 días después de la siembra)
- b) Tardía (floración se tiene entre los 75 – 85 días después de la siembra)

7. ¿Conoce en que tiempo se encuentra su haba en floración después de la siembra?

- a) Sí cuando _____
- b) No

8. ¿Cuánta superficie (hectáreas) cultiva por su variedad de haba o variedades de haba?

| Variedad de haba | Superficie de hectáreas | ¿Por qué esa cantidad? |
|------------------|-------------------------|------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

9. ¿Cuántas veces por año siembra el haba? y ¿cuántos kilos de haba siembra en su superficie?

- a) Una b) Dos c) Tres Kilos de haba que siembra _____

10. ¿En qué fechas siembra el haba?

11. y, ¿Cuándo cosecha?

12. ¿Siembra en riego, humedad residual o en temporal su cultivo de haba?

13. ¿Usted cosecha haba en verde, seca o de las dos? y ¿Por qué de una o de las dos maneras?

14. ¿Cuántos kilos o toneladas obtiene de su producción (considerando todos los cortes que realicé)?

LABORES Y COSTOS DURANTE EL CULTIVO DE HABA

En este apartado me podría describir como realiza todas las labores del cultivo de haba paso a paso.

15. ¿Cómo prepara el suelo, utiliza el tractor o la yunta?, me lo podría describir...

16. **¿Surca el suelo?, ¿Que distancia utiliza entre surco y surco?**

17. **¿Cómo siembra la semilla de haba?**

a) a mano b) con pala c) otro _____

18. **¿Cuántas semillas por pala y a qué distancia entre mata y mata?**

19. **¿Cómo riega el cultivo? o ¿es de temporal? y, ¿cuándo no hay un buen temporal, como riega el cultivo?**

20. **¿Fertiliza el cultivo?**

a) Sí, ¿Cuántas veces? _____ b) no

21. **¿Qué fertilizantes emplea? Sabe usted, ¿cuánto cuesta el fertilizante?** _____

22. **¿En qué etapa de desarrollo de la planta realiza la fertilización? ¿Cuántas aplicaciones realiza y qué cantidad?**

23. **¿Desinfecta el cultivo de algún hongo?**

a) Sí, ¿Cuántas veces? _____ b) No

24. **¿Qué fungicida emplea?**

25. **¿En qué etapa de la planta utiliza el fungicida? ¿Cuántas aplicaciones realiza y qué cantidad?**

26. ¿Aplica algún herbicida?

b) Si, ¿Cuántas veces? _____ b) No

27. ¿qué herbicidas emplea? Sabe usted, ¿cuánto cuesta el herbicida?

28. ¿En qué etapa de la planta la desinfecta? ¿Cuántas aplicaciones realiza y qué cantidad?

29. ¿Utiliza algún plaguicida?

a) Si, ¿Cuántas veces? _____ b) No

30. ¿Cuál es el nombre de los plaguicidas que utiliza? Sabe usted, ¿cuánto cuesta el plaguicida?

31. ¿En qué etapa de la planta utiliza el o los plaguicidas? ¿Cuántas aplicaciones realiza y qué cantidad?

32. ¿Deshierba el terreno en donde se encuentra su cultivo de haba?

a) Si, ¿Cuántas veces lo realiza? _____ b) No

33. ¿En qué etapa de la planta realiza el deshierbe?

34. ¿Cómo cosecha el haba y cuántas personas utiliza para cosechar el haba por corte?

35. En el proceso del cultivo del haba, le ayudan sus familiares a realizar el trabajo

a) Si b) No ¿Quienes? _____

36. Reciben algún pago por el trabajo que realizan

a) Si, ¿Cuánto? _____ b) No

37. ¿Cuántos jornales emplea en cada etapa?

| Etapa | ¿Cuántos jornales en total utiliza en cada etapa del cultivo? | ¿Cuántos son contratados? /¿Cuánto les paga por el día? | | ¿Cuántos son familiares? /¿Cuánto les paga por el día? | |
|--|--|--|--|---|--|
| Preparación del suelo (con tractor o con yunta) | | | | | |
| Siembra | | | | | |
| Fertilización | | | | | |
| Control de maleza | | | | | |
| Plagas | | | | | |
| Cosecha | | | | | |

38. ¿Qué implementos o equipo emplea?

| Implementos o equipo | ¿Qué cantidad de equipo utiliza para el área que cultiva de haba? | ¿Recuerda cuánto le costó? | ¿Cuánto tiempo le dura su equipo? (vida útil) | Me podría apoyar con algunas especificaciones del equipo |
|--|--|-----------------------------------|--|---|
| Bomba | | | | |
| Manguera de nylon o bovina de plástico (canaleta/caño) | | | | |
| Aspersora | | | | |
| Pala | | | | |
| Azadón | | | | |
| Otro... | | | | |

39. ¿Pagan algún servicio?

| Servicio | Es individual o comunal | El pago es...(anual, bimestral o al mes) | ¿Cuánto pagan? |
|----------|-------------------------|--|----------------|
| Luz | | | |
| Agua | | | |
| Otro... | | | |

PRODUCCIÓN Y VENTA DE HABA

40. ¿A como vendió el kilo de haba a menudeo? ¿mayoreo?

41. ¿En dónde o a quién vende su haba?

42. ¿El cultivo de haba le reditúa económicamente? a) Sí b) No ¿por qué?

43. ¿Cuánto representa el ingreso proveniente de la producción de haba de sus ingresos totales (en porcentaje)?

44. ¿Sabe si su cultivo le proporciona una mayor ganancia de lo que otro le podría beneficiar?

a) Sí b) No c) desconoce Si su respuesta es que sí, ¿con respecto a que cultivo?

45. ¿Por qué sigue cultivando el haba?

a) por gusto b) porque obtiene una mayor ganancia c) por costumbre d) otra _____

46. ¿Cuál ha sido su mayor producción? _____ ¿Cuál ha sido su menor producción? _____

47. ¿Cuáles son los principales problemas que afectan la baja producción del cultivo?

a) Enfermedades ¿Cuál, la mancha de chocolate, etc.?

b) El mal tiempo ¿Cuál, lluvias, heladas, sequías, etc.?

c) Otro

48. ¿La baja producción del cultivo de haba, en que le afecta a usted?

49. ¿Qué opinaría si tuviera que producir y vender plantas de 20 días después de que emergieron?

50. ¿Qué beneficios usted considera que le genera sembrar, cosechar y vender plantas de haba de 20 días después de que emergieron?

| Respecto al tiempo | Respecto a la producción | Respecto a la venta |
|--------------------|--------------------------|---------------------|
| | | |

51. Si se requirieran plantas de 20 días después de la emergencia, ¿podría comentarme que etapas del desarrollo del cultivo se tendría que seguir?

| | |
|----------------------------------|--|
| Actividades de campo | |
| Preparar el suelo | |
| Sembrar | |
| Deshierbe | |
| Utilización de algún agroquímico | |
| Cosecha | |

52. ¿Qué costo aproximado le generaría producir plantas de 20 días después de la emergencia?

Cuadro 3.2A Plantilla de costos de producción de haba verde.

| Equipo/Materiales/Insumos | Unidad | Cantidad | Costo unitario | Costo final | Vida útil | Depreciación | Costo total | Observaciones |
|--|----------------|----------|----------------|-------------|-----------|--------------|-------------|---------------|
| COSTOS DE INVERSIÓN | | | | | | | | |
| Bomba sumergible (para pozo) * | Unidad | | \$ | | | \$ | \$ | |
| Manguera de nylon o bovina de plástico (canaleta/caño) * | kilo | | \$ | | | \$ | \$ | |
| Bomba para fumigar* | Pieza | | \$ | | | \$ | \$ | |
| Pala* | Pieza | | \$ | | | \$ | \$ | |
| Azadón* | Pieza | | \$ | | | \$ | \$ | |
| SUBTOTAL | | | | | | | | |
| COSTOS DE OPERACIÓN | | | | | | | | |
| Fertilizantes (varios)** | Bulto | | \$ | | | | \$ | |
| Fungicida (varios)** | Botella | | \$ | | | | \$ | |
| Plaguicida (varios)** | Botella/bulto | | \$ | | | | \$ | |
| Preparación del terreno* | hora (tractor) | | \$ | | | | \$ | |
| Siembra** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Deshierbe ** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Desinfectarla (Enfermedades)** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Plagas** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Fertilizar** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Cosecha** | Jornal | | \$ | | | | \$ | |
| Pago de servicios (luz, agua) | mes | | \$ | | | | \$ | |
| SUBTOTAL | | | | | | | | \$ |
| COSTO TOTAL | | | | | | | | \$ |

Elaboración propia con información obtenida de los productores entrevistados sobre las labores de cultivo de haba verde. *Costos fijos, **Costos variables

Cuadro 3.3A Plantilla de costos de producción de planta de haba bajo un sistema de invernadero.

| COSTO DE INVERSIÓN | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------------|--------------------|------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Equipo/infraestructura/Insumos | Unidad | Cantidad | Costo unitario | Costo final | Vida útil | Depreciación | Costo total | Observaciones |
| Invernadero 100 m ² * | Presupuesto | | \$ | | | | \$ | |
| Bolsa** | kilo | | \$ | | | | \$ | |
| Bomba 1 hp* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Termohigrometro* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Carretilla* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Pala* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Azadón* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Tijeras para podar* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Cubeta de plástico* | Piea | | \$ | | | | \$ | |
| Guantes* | Par | | \$ | | | | \$ | |
| Botas de hule* | Par | | \$ | | | | \$ | |
| Bascula* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| Tinaco* | Pieza | | \$ | | | | \$ | |
| SUBTOTAL | | | | | | | \$ | |
| COSTOS DE OPERACIÓN | | | | | | | | |
| Semilla** | kilo | | | | | | \$ | |
| Composta** | Kilo | | | | | | \$ | |
| Siembra** | Jornal | | | | | | \$ | |
| deshierbe** | Jornal | | | | | | \$ | |
| Cosecha** | Jornal | | | | | | \$ | |
| Pago de luz* | Bimestral | | | | | | \$ | |
| Mantenimiento del invernadero** | Anual | | | | | | \$ | |
| SUBTOTAL | | | | | | | \$ | |
| COSTO TOTAL | | | | | | | \$ | |

*Costos fijos, **Costos variables. Parte de la información documentada fue tomada de Hernández (2019).

Anexos 4A

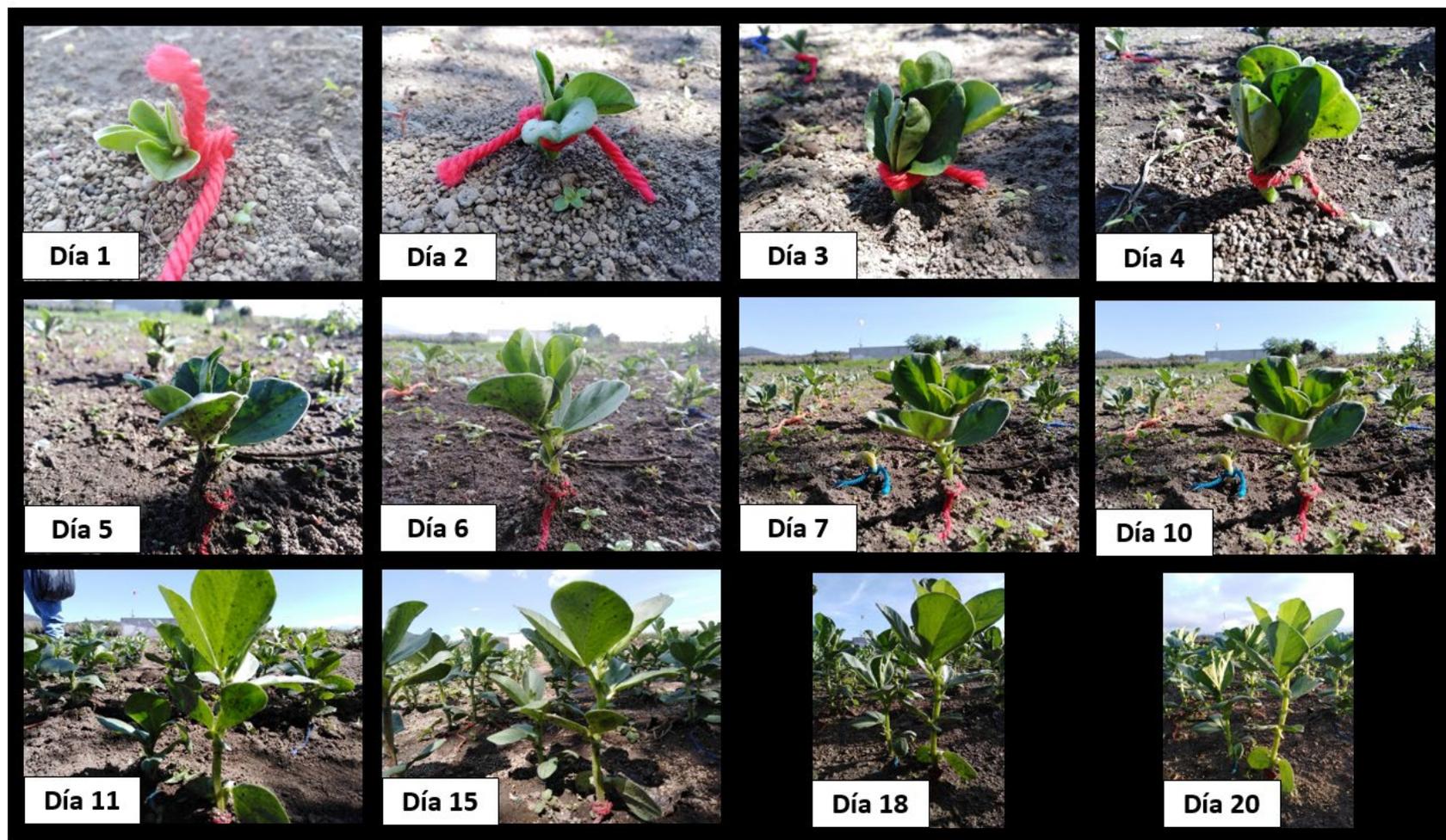


Figura 4.1A Desarrollo de la planta de *Vicia faba* L. de la variedad Matlatzintla, del primer día de la emergencia al día veinte para su cosecha.

Cuadro 4.1A Contenidos de compuestos bioactivos en plantas de variedades de *Vicia faba* L. de 20 días después de la emergencia.

| | CFT (mg EAG g ⁻¹ MS) | FT (mg EQ g ⁻¹ MS) | L-DOPA (mg g ⁻¹ MS) | DPPH (CI₅₀) (μg mL ⁻¹) | AANTI (CI₅₀) (mg mL ⁻¹) |
|---------------|---|---|--|---|--|
| VAR | | | | | |
| Rojita | 131.64 a ± 15.44 | 111.17 ab ± 9.97 | 88.04 a ± 10.02 | 87.68 a ± 2.49 | 74.40 a ± 13.27 |
| ICAMEX-V31 | 127.02 ab ± 12.86 | 91.98 b ± 11.94 | 79.98 ab ± 10.55 | 94.79 ab ± 6.57 | 99.14 a ± 19.32 |
| José María | 111.82 b ± 7.26 | 92.76 b ± 10.84 | 67.30 b ± 18.55 | 106.55 d ± 5.21 | 90.22 a ± 16.47 |
| Matlantzintla | 135.62 a ± 14.44 | 118.58 a ± 20.14 | 79.91 ab ± 5.46 | 97.68 c ± 2.49 | 87.87 a ± 10.55 |
| GER | | | | | |
| Lenta | 130.05 a ± 16.50 | 103.07 a ± 16.58 | 78.51 a ± 9.54 | 96.48 a ± 8.90 | 88.00 a ± 17.13 |
| Violenta | 123.41 a ± 13.92 | 104.11 a ± 18.99 | 79.07 a ± 16.93 | 97.24 a ± 8.37 | 87.40 a ± 17.93 |

VAR: Variedad, GER: Germinación, CFT: Compuestos fenólicos totales, FT: flavonoides totales, L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina, DPPH: Actividad antioxidante, AANTI: Actividad antiinflamatoria. Medias con letras distintas por columna son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 4.2A Comparación de medias de Tukey

| Variedad | L-DOPA | Rutina | Isoorientina |
|-----------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| Rojita | 654.50 a \pm 79.67 | 7.12 a \pm 0.63 | 35.34 a \pm 0.36 |
| ICAMEX-V31 | 495.67 ab \pm 33.60 | 5.46 b \pm 0.36 | 45.10 a \pm 1.88 |
| José María | 510.87 ab \pm 101.10 | 5.26 b \pm 0.48 | 39.06 a \pm 4.37 |
| Matlatzintla | 387.00 b \pm 83.59 | 4.95 b \pm 0.28 | 46.07 a \pm 8.16 |

Todos los compuestos están expresados en g Kg⁻¹ MS. VAR: Variedad.