

La ingesta de frijol Dalia obtenido bajo restricción hídrica mejora el perfil lipídico de ratas obesas

The intake of Dalia bean obtained under water restriction improves the lipid profile of obese rats

Mayra Denise Herrera ^{a,b}, Gabriela Citlalli Salas-Lumbreras^b, Luis Roberto Reveles-Torres ^a, Claudia Araceli Reyes-Estrada ^c, Jesús Adrián López ^{b*}.

^a INIFAP-CEZAC, Carretera Zacatecas-Fresnillo km 24.5, Calera, Zacatecas, México, C.P. 98500. ^b Unidad Académica de Ciencias Biológicas- UAZ. Zacatecas, Zacatecas, México, C.P. 98068. ^c Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zacatecas, México. C.P. 98000.

Autor de correspondencia: jalopez@uaz.edu.mx

RESUMEN

El cultivo del frijol cumple con diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico. Además, ha ganado atención como alimento funcional debido a los fitoquímicos presentes en el grano los cuales aportan beneficios a la salud, previniendo enfermedades como diabetes, obesidad y diferentes tipos de carcinomas. Sin embargo, su efecto benéfico varía dependiendo de los factores climáticos que actúan durante el desarrollo de la planta. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de frijol Dalia (FD) para mejorar el perfil de lípidos de ratas inducidas con obesidad. Cabe resaltar que parte de esta información se ha reportado anteriormente, sin embargo, el propósito del presente escrito es difundir los resultados en español y lograr un mayor alcance entre potenciales lectores. El frijol fue obtenido bajo restricción hídrica durante la etapa vegetativa o reproductiva de la planta (50/100 y 100/50 % de humedad del suelo en etapa vegetativa/reproductiva, respectivamente), durante todo el ciclo (50/50) y de plantas con riego completo (100/100). Ratas macho Wistar fueron alimentadas con dieta alta en grasas (DAG) durante 4 meses. Posteriormente, las ratas fueron alimentadas con DAG suplementada con 20% de FD cocido durante 3 meses. El tratamiento de FD obtenido bajo 100/50 mejoró triglicéridos, colesterol, VLDL e índice aterogénico. Los resultados sugieren que el consumo de FD obtenido bajo restricción hídrica durante la etapa reproductiva (100/50) tiene un mayor efecto hipoglucemiante y reduce la resistencia a la insulina.

Palabras clave: Frijol común, fitoquímicos, perfil lipídico, obesidad.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica y sistémica, ya que la hipertrofia de los adipocitos

ABSTRACT

Bean cultivation fulfills various nutritional and socioeconomic functions. In addition, it has gained attention as a functional food due to the phytochemicals present in the grain, which provide health benefits, preventing diseases such as diabetes, obesity and different types of carcinomas. However, its beneficial effect varies depending on the climatic factors that act during plant development. The objective of this study was to evaluate the ability of Dalia bean (FD) to improve the lipid profile of rats induced with obesity. It should be noted that part of this information has been reported previously, however, the purpose of this paper is to spread the results in Spanish and achieve greater scope among potential readers. The beans were obtained under water restriction during the vegetative or reproductive stage of the plant (50/100 and 100/50% soil moisture in the vegetative/reproductive stage, respectively), during the entire cycle (50/50) and from plants with full irrigation (100/100). Male Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD) for 4 months. Subsequently, the rats were fed DAG supplemented with 20% cooked FD for 3 months. The FD treatment obtained under 100/50 water supply improved triglycerides, cholesterol, VLDL and atherogenic index. The results suggest that FD consumption obtained under water restriction during the reproductive stage (100/50) has a greater hypoglycemic effect and reduces insulin resistance.

Key words: Common bean, phytochemicals, lipid profile, obesity.

INTRODUCTION

Obesity is a chronic and systemic inflammatory disease since adipocyte hypertrophy promotes the synthesis and secretion of inflammatory mediators, leading to insulin resistance and the development of type 2 diabetes. Furthermore, obesity is commonly associated with dyslipi-

promueve la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios, lo que conduce a la resistencia a la insulina y al desarrollo de diabetes tipo 2. Además, la obesidad se asocia comúnmente con dislipidemia, principalmente hipertrigliceridemia, debido a la alteración del metabolismo de los lípidos, disminuyendo la β -oxidación de los ácidos grasos y aumentando la biosíntesis de ácidos grasos, aumentando el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Sharma and Kanwa et al., 2018).

Se han desarrollado agentes farmacológicos como una estrategia para ayudar a perder peso junto con intervenciones en el estilo de vida; sin embargo, varios tratamientos farmacológicos se han retirado del mercado debido a efectos secundarios y/o adversos (Nolan et al., 2020). Por ello, es recomendable buscar productos naturales para mejorar la obesidad y sus complicaciones. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*), junto con otras leguminosas, ha sido ampliamente estudiado como alimento antiobesógeno (Viguiliouk et al., 2017).

La semilla de frijol es una fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales, y fibra dietaria. Además de su importancia nutricional, el frijol es una rica fuente de compuestos bioactivos que incluyen inhibidores de enzimas, compuestos fenólicos y oligosacáridos que muestran efectos promotores de la salud asociados a la prevención de enfermedades crónicas, incluidos cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (González de Mejía et al., 2003; Xu y Chang, 2007). La concentración de fitoquímicos de las semillas depende del genotipo de la planta, sin embargo, los factores ambientales que actúan durante el desarrollo de las semillas influyen en la composición fitoquímica al modular el metabolismo primario y secundario de la planta del cultivo (Herrera et al., 2019). Por lo tanto, la optimización del manejo del riego durante el cultivo de frijol común es necesaria para mejorar el perfil fitoquímico sin comprometer su rendimiento. Se ha investigado ampliamente una estrategia denominada “riego deficitario o restringido” como la aplicación de agua por debajo de los requerimientos totales de agua del cultivo durante las etapas de crecimiento sensibles a la sequía o durante todo el ciclo (Feres y Soriano, 2007; Geerts y Raes, 2009). La restricción de agua durante el período vegetativo, a diferencia de las etapas de floración o formación de frutos, tiene menos impacto en el rendimiento final del cultivo. Los ahorros de agua asociados con la escasez de agua se atribuyen a las reducciones en la conductancia estomática que ocurre cuando las raíces de las plantas encuentran suelo seco y precede a cualquier cambio en el potencial hídrico de las hojas (Webber et al., 2006). Por tanto, el uso de la estrategia de producción bajo restricción hídrica podría inducir la biosíntesis de fitoquímicos con capacidad de mejorar algunos de los padecimientos asociados a la obesidad. El objetivo del presente trabajo fue explorar la capacidad antiobesogénica de la variedad Flor de Junio Dalia obtenida bajo restricción hídrica durante el crecimiento de la planta, y sus efectos

demia, mainly hypertriglyceridemia, due to the alteration of lipid metabolism, decreasing the β -oxidation of fatty acids and increasing the biosynthesis of fatty acids, increasing the risk of cardiovascular diseases (Sharma and Kanwa et al., 2018).

Pharmacological agents have been developed as a strategy to aid weight loss along with lifestyle interventions; however, several pharmacological treatments have been withdrawn from the market due to side and/or adverse effects (Nolan et al., 2020). Therefore, it is highly recommended to look for natural products to improve obesity and its complications. The common bean (*Phaseolus vulgaris*), along with other legumes, has been widely studied as an anti-obesogenic food (Viguiliouk et al., 2017).

The bean seed is an important source of protein, vitamins and minerals, and dietary fiber. In addition to its nutritional importance, beans are a rich source of bioactive compounds including enzyme inhibitors, phenolic compounds and oligosaccharides that show health-promoting effects associated with the prevention of chronic diseases, including cancer, cardiovascular diseases, obesity and diabetes (González de Mejía et al., 2003; Xu and Chang, 2007). The concentration of phytochemicals in seeds depends on the genotype of the plant; however, environmental factors that act during seed development influence the phytochemical composition by modulating the primary and secondary metabolism of the crop plant (Herrera et al., 2019). Therefore, optimization of irrigation management during common bean cultivation is necessary to improve the phytochemical profile without compromising its performance. A strategy called “deficit or restricted irrigation” has been widely investigated as applying water below the crop's total water requirements during drought-sensitive growth stages or throughout the entire cycle (Feres and Soriano, 2007; Geerts and Raes, 2009). Water restriction during the vegetative period, unlike the flowering or fruiting stages, has less impact on the final crop yield. Water savings associated with water scarcity are attributed to reductions in stomatal conductance that occur when plant roots encounter dry soil and precede any change in leaf water potential (Webber et al., 2006). Therefore, the use of the production strategy under water restriction could induce the biosynthesis of phytochemicals with the capacity to improve some of the conditions associated with obesity. The objective of the present work was to explore the anti-obesogenic capacity of the Flor de Junio Dalia cultivar obtained by water restriction during plant growth, and its effects against lipid metabolism disorders associated with obesity.

MATERIAL AND METHODS

Germplasm, test site and irrigation regimes during common bean seed cultivation.

Germplasm, test location and irrigation regimes during common bean seeds cultivation ‘Dalia’ is a Flor de

contra los trastornos en el metabolismo de lípidos asociados a la obesidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma, lugar de ensayo y regímenes de riego durante el cultivo de semillas de frijol común.

‘Dalia’ es una variedad de frijol común tipo Flor de Junio de la raza Jalisco con un hábito de crecimiento tipo III indeterminado; sus granos tienen un fondo color crema con rayas rosas (Calderón-Guzmán et al., 2020). Durante el ciclo primavera-verano de 2016 se estableció una parcela experimental con Dalia en el Campo Experimental Zacatecas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEZAC-INIFAP). El frijol se cultivó en cuatro condiciones de humedad del suelo durante el ciclo de crecimiento en un invernadero para protegerlo de la lluvia. El experimento se condujo bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones; la unidad experimental estuvo compuesta por cuatro surcos de 5 m de largo. Cada tratamiento se diferenció según el porcentaje de humedad del suelo durante las etapas vegetativa y reproductiva del ciclo de desarrollo de la planta (Tabla 1). El riego se realizó con un sistema de riego por goteo instalado mediante tubería de polietileno de ½ pulgada de diámetro, con goteros de 0.20 m cada uno y un caudal de agua de 0.94 L/h por emisor. Para programar el riego de cada tratamiento de humedad, se utilizó un sensor Watermark® modelo 200SS-5 de resistencia eléctrica. Con la ayuda de una barra de metal de ¾” de diámetro, se hizo un hueco en el centro de la parcela experimental donde se colocó el sensor a 30 cm de profundidad. Posteriormente, se utilizó el lector equipado con una pantalla LCD para observar las lecturas diarias en centibares/kilopascals y registrar el control de humedad. Las plantas con signos de síntomas de enfermedades aéreas o radiculares se retiraron del experimento.

Junio type common bean cultivar from the Jalisco race with a type III indeterminate growth habit; its grains have a cream-colored background with pink stripes [1]. An experimental plot using Dalia was established during the spring-summer of 2016 at the Zacatecas Research Station of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP, México). The cultivar was grown under four soil moisture conditions during the growing cycle in a greenhouse to protect them from rainfall. The experiment was conducted in a randomized complete block design replicated four times; the experimental unit composed four 5 m long rows. Each treatment was differentiated upon the percentage of soil humidity during the vegetative and reproductive stages of the plant developing cycle (Table 1). Irrigation was performed with a drip irrigation system installed using ½ inch diameter polyethylene drip tubing, with drip emitters at 0.20 m each and a water flow rate of 0.94 L/h per emitter. To program the irrigation of each irrigation treatment, a Watermark® humidity sensor, model 200SS-5 of electrical resistance, was installed in each of the experimental plots previously calibrated. With the help of a ¾” diameter metal bar, a hole was made in the center of the experimental plot where the sensor was placed at a 30 cm depth. Subsequently, the reader equipped with an LCD screen was used to observe the daily readings in centibars/kilopascals and record the humidity control. Plants with signs of aerial or root disease symptoms were removed from the experiment.

Cooked common bean samples preparation

At physiological maturity, common bean plants were hand harvested removing 0.5 m from each row end. After threshing, samples from each irrigation treatment were washed and cooked (1:5, w/v at 90 ± 1 °C), freeze-dried with cooking water and milled with a domestic grinder (Krupps GX4100, México), and stored at 4 °C until digestive enzyme inhibition assays and treatment-diets preparation for an obesity Wistar rat model.

Tabla 1. Porcentaje de humedad del suelo durante el ciclo de desarrollo de la planta de frijol.

Tabla 1. Porcentaje de humedad del suelo durante el ciclo de desarrollo de la planta de frijol.

<u>Tratamiento</u>	Humedad del suelo Etapa vegetativa (%)	Humedad del suelo Etapa reproductiva (%)
100/100	100	100
100/50	100	50
50/50	50	50
50/100	50	100

Preparación de muestras de frijol común cocido.

En la madurez fisiológica, las plantas de frijol común se cosecharon a mano quitando 0.5 m de cada extremo de la hilera. Después de la trilla, las muestras de cada tratamiento de riego fueron lavadas y cocidas (1:5, p/v

Phytochemical characterization of cooked Dalia bean samples

The phytochemical characterization was made in each experimental unit, accounting for four replicas per irrigation treatment.

a 90 ± 1 °C), liofilizadas con agua de cocción, molidas con un molinillo doméstico (Krupps GX4100, México), y almacenadas en 4 °C hasta su uso en un modelo preclínico de obesidad en ratas Wistar.

Caracterización fitoquímica de muestras de frijol *Dalia cocido*.

La caracterización fitoquímica se realizó en cada unidad experimental, contabilizando cuatro réplicas por tratamiento de riego. Para la proteína total, el nitrógeno total se determinó mediante el ensayo Micro-Kjeldahl (920.15) (Horwitz et al. 1975). La fibra dietética total y las fracciones solubles e insolubles se cuantificaron utilizando un kit de ensayo de fibra dietaria total (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El almidón resistente se cuantificó a partir de la fracción insoluble de la fibra dietaria como lo describe Saura-Calixto et al. (1993), la concentración final de glucosa se analizó utilizando un kit GOD-PAP (Randox Laboratories Ltd., Reino Unido) y una solución estándar de glucosa (0.98 mg/dL) se utilizó como control. El almidón resistente se calculó como glucosa (mg) x 0.9.

Los compuestos fenólicos se extrajeron según lo propuesto por Xu y Chang, (2007) con acetona/agua/ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v). Los polifenoles totales se cuantificaron mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1985) y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de frijol seco (mg GAE g-1). Los taninos condensados se determinaron mediante el método de vainillina-HCl (Desphande et al. 1985) y los flavonoides se cuantificaron mediante el ensayo de AlCl₃ (Liu et al., 2002). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de (+)-catequina por gramo (mg CAE g-1). Las saponinas se extrajeron y cuantificaron según lo propuesto por Hiai et al. (1976) y los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido oleanólico por gramo (mg OAE g-1).

Modelo de obesidad en ratas Wistar

En el experimento se utilizaron ratas Wistar jóvenes con un peso corporal de 70-110 g (Universidad Autónoma de Zacatecas, Ciudad de México, México) (UAZ-2015-36851). Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas mexicanas (NOM-62-ZOO-1999) y las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud (National Institutes of Health, 2002) para la investigación animal, previa autorización del protocolo por parte del Comité de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Después de una semana de adaptación, las ratas Wistar se asignaron al azar en seis grupos (n = 10 por grupo): un grupo de control sano recibió una dieta estándar de 3.39 calorías por gramo de alimento (12 % de humedad, 23 % de proteína, 3 % lípidos, 7% cenizas, 49% carbohidratos y 6% fibra total); y grupos obesos alimentados con una dieta alta en grasa (DAG). La DAG se preparó agregando un 32% de grasa magra a la dieta estándar, lo que resultó en una ingesta de

For total protein, total nitrogen was determined by Micro-Kjeldahl assay (920.15) (Horwitz et al. 1975). Total dietary fiber and the soluble and insoluble fractions were quantified using a Total Dietary Fiber Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's instructions. The resistant starch was quantified from the insoluble fraction of the dietary fiber as described by Saura-Calixto et al. (1993), the final glucose concentration was analyzed using a GOD-PAP kit (Randox Laboratories Ltd., UK), and a glucose standard solution (0.98 mg/dL) was used as control. The resistant starch was calculated as glucose (mg) x 0.9.

Phenolic compounds were extracted according to Xu y Chang, (2007), with acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v) [4]. Total polyphenols were quantified by the Folin-Ciocalteu assay (Singleton et al., 1985), and results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry bean (mg GAE g-1). Condensed tannins were determined by the vanillin-HCl method (Desphande et al. 1985), and flavonoids were quantified by the AlCl₃ assay (Liu et al., 2002). Results were expressed as mg of (+)-catechin equivalents per gram (mg CAE g-1). Saponins were extracted and quantified as reported by Hiai et al and results were expressed as micrograms of oleanolic acid equivalents per gram (µg OAE g-1) (Hiai et al. 1976).

Obesity Wistar rat model

Young Wistar rats with a body weight of 70-110 g (Universidad Autónoma de Zacatecas, Mexico City, Mexico) were used in the experiment (UAZ-2015-36851). Experiments were performed in accordance with the Mexican guidelines (NOM-062-ZOO-1999) and the National Institute of Health (National Institutes of Health, 2002) recommendations for animal research, prior authorization of the protocol by the Committee of the Universidad Autónoma de Zacatecas. After one week of adaptation, the Wistar rats were assigned into 6 groups at random (n = 10 per group): a healthy control group was fed a standard diet of 3.39 calories per gram of food (12% moisture, 23% protein, 3% lipids, 7% ash, 49% carbohydrates and 6% total fiber); and obese groups fed a high fat diet (HFD). The HFD was prepared by adding 32% lean fat to the standard diet, resulting in an intake of 6.27 calories per gram of food. After four months of follow-up, the treatment groups were assigned: an obese control, and four treated-groups with cooked common bean. Treated-groups were assigned according to the water supplementation regimens during the vegetative and reproductive stage of *Dalia* production (100/100, 100/50, 50/50 and 50/100 vegetative / reproductive stage), each of these groups were supplemented with 20% (p/p) of cooked beans obtained from the different *Dalia* bean plants. Food and water were provided ad libitum. To test if beans addition to high fat diet has a preventive effect on body weight gain the rats were monitored each week and the body mass was measured. After three more months of treatment with

6.27 calorías por gramo de alimento. Después de cuatro meses de seguimiento, se asignaron los grupos de tratamiento: un control obeso y cuatro grupos de tratamiento con frijol común cocido. Los grupos tratados fueron asignados de acuerdo a los regímenes de suplementación de agua durante la etapa vegetativa y reproductiva de producción de Dalia (100/100, 100/50, 50/50 y 50/100 etapa vegetativa/reproductiva), cada grupo fue suplementado con 20 % (p/p) de frijol cocido obtenido de las diferentes plantas de frijol Dalia. Se proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Luego de tres meses de tratamiento, los animales fueron sacrificados bajo anestesia para obtener una muestra de sangre por punción cardíaca y obtener el suero que fue inmediatamente separado y almacenado a -80 °C hasta su análisis.

Evaluaciones bioquímicas

Después del sacrificio, se determinó la concentración sérica de triglicéridos (TG), colesterol (COL), y lipoproteína de alta densidad (HDL), utilizando kits comerciales (Randox Laboratories Ltd. UK). Posteriormente se calculó la lipoproteína de baja densidad (LDL) utilizando la fórmula de Friedwald: $LDL = COL - HDL - (TG/5)$. La lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) se derivó basándose en la fórmula: $VLDL = TG/2.2$. El índice aterogénico se calculó como la relación transformada logarítmicamente de las concentraciones molares de TG a HDL-C (Nansseu et al. 2016).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como valores medios \pm error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), y las diferencias se consideraron significativas si el valor de probabilidad fue menor a 0,05 ($p \leq 0,05$) con la prueba de Fisher. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Minitab. Además, se realizó un análisis post hoc discriminante canónico multivariado con base en la prueba Lambda de Wilks y un análisis de correlación de Pearson considerando la caracterización fitoquímica utilizando el software JMP 5.0.1 (SAS Institute).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Concentración de fitoquímicos de frijol Dalia obtenido bajo diferentes tratamientos de humedad del suelo.

Según lo reportado por Salas-Lumbreras et al. (2022) no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína total, lo que concuerda con informes anteriores donde el estrés hídrico no causó una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de proteínas de genotipos de frijol Pinto (Herrera et al., 2021). La concentración de fibra dietaria total y soluble fue 12 y 33% mayor en el frijol obtenido del tratamiento de riego 50/100, mientras que la fracción insoluble y su constituyente almidón resistente fueron mayores en el frijol del tratamiento 100/50 con un aumento del 4 y 93%

cooked Dalia beans, the animals were sacrificed under anesthesia to obtain a blood sample by cardiac puncture and obtain the serum that was immediately separated and stored at -80 °C until analysis.

Biochemical evaluations

After sacrifice, glucose, total cholesterol (CHOL), triglycerides (TG) and high density lipoprotein (HDL) were determined from serum samples under fasting conditions using commercial kits (Randox Laboratories Ltd. UK). Low-density lipoprotein (LDL) was then calculated using Friedwald's formula: $LDL = CHOL - HDL - (TG/5)$. The very low-density lipoprotein (VLDL) was derived based on the formula: $VLDL = TG/2.2$. The atherogenic index of plasma was calculated as the logarithmically transformed ratio of molar concentrations of TG to HDL-C (Nansseu et al. 2016).

Statistical analysis

Data was expressed as mean values \pm standard error (SE). The statistical analysis was performed by the analysis of variance (ANOVA), and differences were considered to be significant if the probability value was less than 0.05 ($p \leq 0.05$) with the Fisher's test. Statistical analysis were performed using the Minitab software. Additionally, a multivariate post hoc canonical discriminant analysis based on the Wilk's Lambda test, and Pearson's correlation analysis were performed considering the phytochemical characterization using the JMP software 5.0.1 (SAS Institute).

RESULTS AND DISCUSSION

Concentration of Dalia bean phytochemicals obtained under different soil moisture treatments.

According to Salas-Lumbreras et al. (2022) no statistical differences were observed on total protein content, this agrees with previous reports where water stress did not caused a statistically significant difference on seed proteins of Pinto bean genotypes (Herrera et al., 2021). The concentration of total and soluble dietary fiber was 12 and 33% higher in beans obtained from the 50/100 irrigation treatment, whereas the insoluble fraction and its resistant starch constituent were higher in beans from the 100/50 treatment by a 4 and 93% increase respectively, in comparison to beans from well-watered plants (Table 1). Zheng et al. (2014) reported that stress caused by a deficit in water supply on *Gossypium hirsutum* increases the concentration of fiber to counteract the oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS). The current results show that a restricted irrigation improves the non-digestible carbohydrates content. Statistical differences ($p < 0.05$) were observed on the phenolics concentration. Both soil moisture treatments that included a water restriction during the reproductive stage, led to the highest

respectivamente, en comparación con el frijol obtenido de plantas bien regadas (Tabla 2). Zheng et al. (2014) mencionaron que el estrés causado por un déficit en el suministro de agua en *Gossypium hirsutum* aumenta la concentración de fibra para contrarrestar el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Los resultados de esta investigación muestran que un riego restringido mejora el contenido de carbohidratos no digeribles. Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la concentración de los compuestos fenólicos. Ambos tratamientos de humedad del suelo que incluyeron una restricción hídrica durante la etapa reproductiva, llevaron a la mayor concentración de fenoles y flavonoides totales (50/50), y taninos condensados y antocianinas totales (50/100) con incrementos de 27, 6, 12 y 19%, respectivamente. La producción acelerada de ERO como respuesta metabólica al estrés causado por la restricción hídrica, estimula la actividad de las enzimas antioxidantes y, por tanto, la síntesis de polifenoles para soportar el daño oxidativo bajo una condición tan adversa (Figueroa-Pérez et al., 2014). Las saponinas también son metabolitos secundarios influenciados por factores que comprenden estímulos ambientales, como la disponibilidad de agua en el suelo, por lo tanto, se obtienen resultados de mayor síntesis después de aplicar un riego reducido al cultivo vegetal (Nasrollahi et al. 2014). Los granos 100/50 tuvieron el mayor contenido total de saponinas (Tabla 2).

Los datos de la caracterización de fitoquímicos se analizaron de forma colectiva cuando se observaron dife-

concentration of total phenols and flavonoids (50/50), and condensed tannins and total anthocyanins (50/100) with increases of 27, 6, 12 and 19%, respectively.

The accelerated production of ROS as a metabolic response to stress caused by hydric restriction, stimulates antioxidant enzymes activity and thus, the synthesis of phenolics to endure oxidative damage under such an adverse condition (Figueroa-Pérez et al., 2014). Saponins are also secondary metabolites influenced by factors that comprise environmental stimuli, as the availability of soil water, therefore, higher synthesis results after applying special irrigation to the plant culture (Nasrollahi et al. 2014). The 100/50 beans had the highest total saponins content (Table 2).

The phytochemical data was analyzed collectively, when statistical differences were observed among treatments, using post hoc canonical discriminant analysis to identify differences in the a priori defined irrigation treatments. According to Zhu (2014), there is a need to improve data presentation when there are multiple variables.

The main advantage of multivariate techniques is that the relationships between all dependent variables are considered instead of testing each variable in isolation.

Tabla 2. Caracterización fitoquímica del frijol común cv. Dalia obtenida mediante diferentes tratamientos de humedad del suelo.

Table 2. Phytochemical characterization of common bean cv. Dalia obtained through different soil moisture treatments.

Fitoquímicos	Tratamientos de humedad del suelo			
	100/100	100/50	50/50	50/100
Proteína total (g/100 g)	19.67 ± 0.43 a	20.36 ± 0.28 a	20.09 ± 0.34 a	21.22 ± 0.66 a
Carbohidratos no digeribles				
Fibra dietaria total (g/100 g)	36.91 ± 0.70 b	36.56 ± 0.67 b	36.37 ± 0.93 b	41.44 ± 3.61 a
Fibra dietaria soluble (g/100 g)	9.35 ± 0.99 b	8.37 ± 0.50 c	9.06 ± 0.62 bc	12.45 ± 0.12 a
Fibra dietaria insoluble (g/100 g)	28.25 ± 0.47 b	29.41 ± 0.46 a	27.10 ± 0.75 c	28.90 ± 0.32 ab
Almidón resistente (g/100 g)	4.19 ± 2.67 b	8.09 ± 1.33 a	7.05 ± 0.63 a	6.15 ± 0.46 ab
Compuestos fenólicos				
Fenoles totales (mg EAG/g)	2.43 ± 0.07 c	2.81 ± 0.05 b	3.10 ± 0.07 a	2.82 ± 0.09 b
Flavonoides totales (mg ECA/g)	3.44 ± 0.56 a	3.66 ± 0.21 a	3.56 ± 0.29 a	2.79 ± 0.08 b
Taninos Condensados (mg ECA/g)	5.40 ± 0.28 b	5.67 ± 0.14 b	0.63 ± 0.04 c	6.07 ± 0.32 a
Antocianinas totales (mg EC3G/g)	0.017 ± 0.001 b	0.015 ± 0.001 bc	0.014 ± 0.000 c	0.020 ± 0.001 a
Saponinas				
Saponinas totales (mg EOA/g)	4.69 ± 0.26 a	4.71 ± 0.49 a	4.14 ± 0.36 b	3.57 ± 0.16 c

Los valores se presentan como la media ± DE. Letras diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) con la prueba de Fisher. EAG, equivalentes de ácido gálico; ECA, equivalentes de catequinas; EC3G, equivalentes de cianidina 3-glucósido; EOA, equivalentes de ácido oleanólico.

Values are presented as mean values ± SD. Different letters among rows indicate significant ($p < 0.05$) statistical difference with Fisher's test. GAE, gallic acid equivalents; CAE, catechin equivalents; C3GE, cyanidin 3-glucoside equivalents; OAE, oleanolic acid equivalents.

rencias estadísticas entre tratamientos, mediante un análisis post hoc discriminante canónico para identificar diferencias en los tratamientos de riego definidos a priori. Según Zhu (2014), existe la necesidad de mejorar la presentación de datos cuando se tiene múltiples variables. La principal ventaja de las técnicas multivariadas es que se consideran las relaciones entre todas las variables dependientes en lugar de probar cada variable de forma aislada. Thomas (2014) afirmó que “los investigadores todavía utilizan con demasiada frecuencia análisis de datos univariados cuando los análisis multivariados son más apropiados”. Con base en la prueba Wilks Lambda ($p < 0.0001$), los tratamientos de riego fueron significativamente diferentes, pero iguales entre sus réplicas; por lo tanto, se agruparon las muestras de frijol de cada unidad experimental para usarlos en el experimento *in vivo* (Figura 1). Las tres primeras funciones canónicas (C1, C2 y C3) explicaron el 100% de la variación total, representando cada una el 73, 24,7 y 2,3% respectivamente. Según las puntuaciones de carga para cada variable respuesta, las correlaciones entre las variables respuesta son las siguientes: la primera función canónica representa una alta concentración de TF (positivamente) y AN, CT, TDF y SDF (negativamente). Mientras tanto, la segunda función canónica explica positivamente la concentración de TS y negativamente la IDF, mientras que la tercera función canónica contribuye positivamente a la concentración de TP y RS. Estos resultados diferencian el tratamiento 100/50, el tratamiento destacado en el estudio *in vivo*, por su concentración de flavonoides totales, fibra dietaria insoluble, almidón resistente y saponinas totales.

Perfil lipídico de ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa tratadas con frijol Dalia.

El perfil lipídico de los grupos control y tratado con Dalia se evaluó después del sacrificio (Tabla 2). Cuando la dieta de ratas obesas se complementó con frijol cocido obtenido mediante restricción hídrica durante la etapa reproductiva de las plantas, se observó mejoría en el perfil lipídico. El tratamiento 100/50 llevó a una disminución importante del colesterol sérico del 22% y de los triglicéridos del 71%, correlacionado negativamente con los compuestos polifenólicos, especialmente los taninos condensados y la fracción insoluble de la fibra dietaria (Figura 2), en comparación con el control obeso. Por otro lado, la LDL y VLDL disminuyeron en 15 y 71%, en comparación con el mismo grupo control, mientras que se registró un aumento de 136% en HDL en el tratamiento 100/50. Por el contrario, cuando las plantas fueron irrigadas durante todo el ciclo, la inclusión de frijol cocido no mostró una protección importante contra los niveles altos de colesterol y LDL, y estos valores no fueron estadísticamente diferentes de los datos registrados en animales alimentados con la dieta alta en grasa y suplementado con frijol obtenido bajo el tratamiento 50/50. La concentración más alta de triglicéridos y VLDL, y la más baja de HDL, entre las ratas obesas tratadas con frijol se obtuvo de las ratas que consu-

Thomas (2014) stated that “researchers still too often use univariate data analysis when multivariate analyzes are more appropriate”. Based on Wilks’ Lambda test ($p < 0.0001$), the irrigation treatments were significantly different, but equal among its replicas; therefore, beans from each experimental unit were pooled to be used in the *in vivo* experiment (Figure 1). The first three canonical functions (C1, C2 and C3) explained 100% of the total variation, each representing 73, 24.7 and 2.3% respectively. Based on the loading scores for each response variable, the correlations between the response variables are as follows: The first canonical function represents a high concentration of TF (positively) and AN, CT, TDF, and SDF (negatively). Meanwhile, the second canonical function positively explains the concentration of TS and IDF negatively, while the third canonical function positively contributes to the concentration of TP and RS. These results differentiate the 100/50 treatment, the treatment highlighted in the *in vivo* study, by its concentration of total flavonoids, insoluble dietary fiber, resistant starch and total saponins.

Lipid profile of Wistar rats fed a high-fat diet treated with Dalia bean.

The lipid profile of control and Dalia-treated groups were evaluated after sacrifice (Table 2). When diet of obese rats was supplemented with beans obtained by water restriction during the reproductive stage, the lipid profile was improved. Treatment 100/50 led to an important decrease of serum cholesterol of 22%, and triglycerides of 71%, negatively correlated to polyphenol compounds, specially condensed tannins, and the insoluble fraction of the dietary fiber (Figure 2), in comparison to the obese control. Meanwhile, LDL and VLDL were decrease by 15% and 71%, comparing to the obese control, while an increase of 136% of HDL was recorder in 100/50 treatment.

Conversely, when plants were fully irrigated during the whole cycle, the inclusion of the cooked beans did not exhibit an important protection against high serum cholesterol and LDL levels, and these values were not statistically different from data registered from animals fed with HFD supplemented with the 50/50 obtained beans. The highest concentration of triglycerides and VLDL, and lowest HDL, among bean-treated obese rats was obtained from rats that consumed the 50/50 cooked beans. 50/50 treatment exhibited an increase of 78 and 45% in triglycerides and LDL, respectively, in comparison to HC. However, data shows that levels of both response variables were 30 and 3 % lower than the obese control (Table 2).

These effects could be due to the decreased absorption of dietary lipids or low synthesis in the liver. Supporting our findings, Mendoza-Sánchez et al. (2016) mentioned that the intake of Dalia bean sprouts regulates the lipid profile of obese Wistar rats. The hypotriglyceridemic effect of common bean was associated with intestinal digestion and absorption, through the inhibitory activity of the pancreatic lipase (Sun et al., 2019). Furthermore, de

mieron frijol cocido del tratamiento de humedad 50/50. El tratamiento 50/50 presentó un aumento de 78 y 45% en triglicéridos y LDL, respectivamente, en comparación con control sano. Sin embargo, los datos muestran que los niveles de ambas variables de respuesta fueron un 30 y 3% más bajos que los del control obeso (Tabla 2).

Lima et al. (2019) reported that bean intake reduces the concentration of triglycerides, cholesterol and LDL, whereas HDL remained unchanged. The beneficial effect on lipid profile might be related to higher content of dietary fiber, which decrease total cholesterol by the ability to

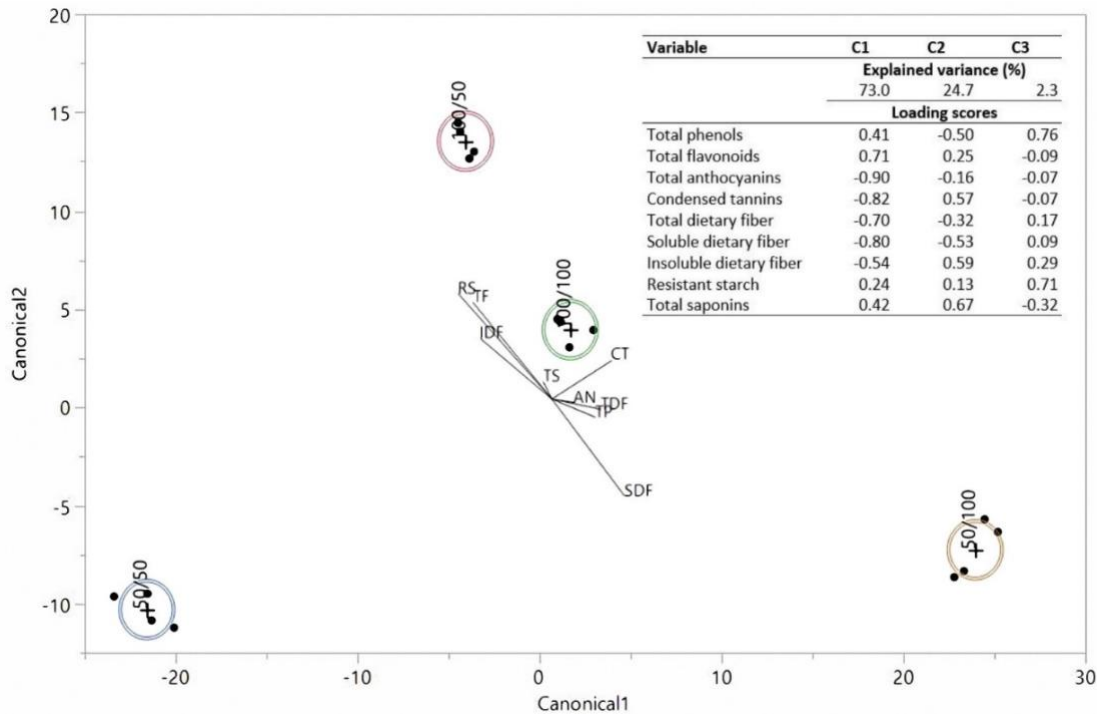


Figura 1. Análisis discriminante canónico multivariado de los compuestos fitoquímicos de las semillas de frijol *Dalia* cocido cultivado bajo diferentes tratamientos de humedad del suelo. TDF, fibra dietaria total; SDF, fibra dietaria soluble; IDF, fibra dietaria insoluble; RS, almidón resistente; TP, fenoles totales; TF, flavonoides totales; AN, antocianinas totales; CT, taninos condensados; TS, saponinas totales. Con base en la prueba Lambda de Wilks ($p < 0,0001$), los tratamientos de riego fueron significativamente diferentes según la caracterización fitoquímica.

Figure 1. Multivariate canonical discriminant analysis of phytochemical compounds of cooked *Dalia* bean seeds grown under different soil moisture treatments. TDF, total dietary fiber; SDF, soluble dietary fiber; IDF, insoluble dietary fiber; RS, resistant starch; TP, total phenols; TF, total flavonoids; NA, total anthocyanins; CT, condensed tannins; TS, total saponins. Based on Wilks' Lambda test ($p < 0.0001$), irrigation treatments were significantly different according to phytochemical characterization.

Estos efectos podrían deberse a la disminución de la absorción de lípidos de la dieta o a una baja síntesis en el hígado. Respalda nuestros hallazgos, Mendoza-Sánchez et al. (2016) mencionaron que la ingesta de germinados de frijol *Dalia* regula el perfil lipídico de ratas Wistar obesas. El efecto hipotriglicéridémico del frijol común se asoció con la digestión y absorción intestinal, a través de la actividad inhibidora de la lipasa pancreática (Sun et al., 2019). Además, de Lima et al. (2019) mencionaron que la ingesta de frijol reduce la concentración de triglicéridos, colesterol y LDL, mientras que el HDL permanece sin cambios. El efecto benéfico sobre el perfil lipídico podría estar relacionado con un mayor contenido de fibra dietaria, que

chelate bile acids and reduce the absorption of lipids in the intestinal lumen (de Lima et al. 2019). For this study, the highest negative correlation of insoluble dietary fiber was calculated for VLDL (Figure 2). The atherogenic index, a significant predictor of atherosclerosis, was also influenced by the water restriction during bean production. The 100/50 beans exhibited the highest protection among the remaining treatments, and was not statistically different from the HC, whereas its index value was 71% lower than the calculated from the OC (Table 2). Obese rats developed dyslipidemia, characterized by increased serum triglycerides, cholesterol, LDL and VLDL, and decrease serum HDL. The consequence of this physiological dysfunction is an increa-

disminuye el colesterol total por la capacidad de quelar los ácidos biliares y reducir la absorción de lípidos en el intestino (de Lima et al. 2019).

sed risk for the development of atherosclerosis. Figure 2 shows that insoluble fiber and condensed tannins have a high influence on this response variable.

Tabla 2. Efecto del frijol común cv. Dalia sobre el perfil lipídico sérico y el índice aterogénico después del tratamiento con frijol común Dalia cocido.

Table 2. Phytochemical characterization of common bean cv. Dalia obtained through different soil moisture treatments.

Phytochemicals	Soil Moisture Treatments			
	100/100	100/50	50/50	50/100
Total protein (g/100 g)	19.67 ± 0.43 a	20.36 ± 0.28 a	20.09 ± 0.34 a	21.22 ± 0.66 a
Non digestible carbohydrates				
Total dietary fiber (g/100 g)	36.91 ± 0.70 b	36.56 ± 0.67 b	36.37 ± 0.93 b	41.44 ± 3.61 a
Soluble dietary fiber (g/100 g)	9.35 ± 0.99 b	8.37 ± 0.50 c	9.06 ± 0.62 bc	12.45 ± 0.12 a
Insoluble dietary fiber (g/100 g)	28.25 ± 0.47 b	29.41 ± 0.46 a	27.10 ± 0.75 c	28.90 ± 0.32 ab
Resistant starch (g/100 g)	4.19 ± 2.67 b	8.09 ± 1.33 a	7.05 ± 0.63 a	6.15 ± 0.46 ab
Phenolic compounds				
Total phenols (mg GAE/g)	2.43 ± 0.07 c	2.81 ± 0.05 b	3.10 ± 0.07 a	2.82 ± 0.09 b
Total flavonoids (mg CAE/g)	3.44 ± 0.56 a	3.66 ± 0.21 a	3.56 ± 0.29 a	2.79 ± 0.08 b
Condensed tannins (mg CAE/g)	5.40 ± 0.28 b	5.67 ± 0.14 b	0.63 ± 0.04 c	6.07 ± 0.32 a
Total anthocyanins (mg C3GE/g)	0.017 ± 0.001 b	0.015 ± 0.001 bc	0.014 ± 0.000 c	0.020 ± 0.001 a
Saponins				
Total saponins (mg OAE/g)	4.69 ± 0.26 a	4.71 ± 0.49 a	4.14 ± 0.36 b	3.57 ± 0.16 c

Los valores se presentan como valores medios ± SE. Los valores se expresan como ¹mg/dL y ²unidades arbitrarias (AU). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (p<0,05) con la prueba de Fisher.

Values are presented as mean values ± SD. Different letters among rows indicate significant (p <0.05) statistical difference with Fisher's test. GAE, gallic acid equivalents; CAE, catechin equivalents; C3GE, cyanidin 3-glucoside equivalents; OAE, oleanolic acid equivalents.

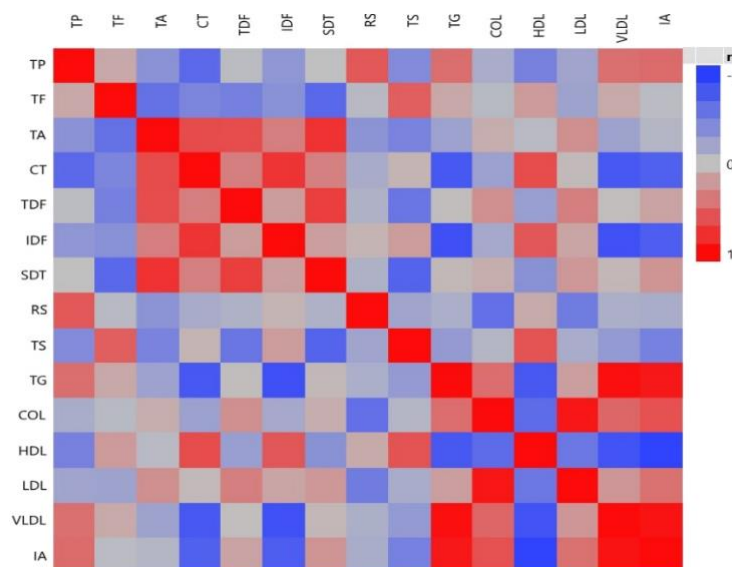


Figura 2. Mapa de calor de correlación de Pearson. TP, fenoles totales; TF, flavonoides totales; TA, antocianinas totales; CT, taninos condensados; TDF, fibra dietética total; SDF, fibra dietética soluble; TDF, fibra dietética insoluble; RS, almidón resistente; TS, saponinas totales; TG, triglicéridos, COL, colesterol; IA, índice aterogénico. Se calculó la correlación de Pearson (p≤ 0.05) entre las características clínicas y los fitoquímicos del frijol Dalia. La escala de colores representa el nivel escalado de cada variable: rojo, valores de correlación negativos; Azul, valores de correlación positiva. Las correlaciones significativas de Pearson entre las características fitoquímicas y clínicas fueron las siguientes: TG x CT (r = -0,8043, p =0,0161); TG x FDI (r = -0,8622, p =0,0059); COL x RS (r= -0.6173, p=0.0108); HDL x CT (r= 0.6348, p= 0.0082); HDL x

IDF ($r=0.5745$, $p=0.0199$) VLDL x CT ($r = -0,8023$, $p =0,0166$); VLDL x IDF ($r=$, $p<0.0001$); CT x AI ($r = -0,7473$, $p =0,0331$); IDF x IA ($r= -0.7590$, $p=0.0007$).

Figure 2. Pearson correlation heat map. TP, total phenols; TF, total flavonoids; TA, total anthocyanins; CT, condensed tannins; TDF, total dietary fiber; SDF, soluble dietary fiber; IDF, insoluble dietary fiber; RS, resistant starch; TS, total saponins; TG, triglycerides, COL, cholesterol; IA, atherogenic index. Pearson's correlation ($p \leq 0.05$) was calculated between clinical characteristics and phytochemicals of Dalia bean. The color scale represents the scaled level of each variable: red, negative correlation values; Blue, positive correlation values. The significant Pearson correlations between phytochemical and clinical characteristics were as follows: TG x CT ($r = -0.8043$, $p =0.0161$); TG x FDI ($r = -0.8622$, $p =0.0059$); COL x RS ($r = -0.6173$, $p=0.0108$); HDL x CT ($r = 0.6348$, $p= 0.0082$); HDL x IDF ($r=0.5745$, $p=0.0199$) VLDL x CT ($r = -0.8023$, $p =0.0166$); VLDL x IDF ($r=$, $p<0.0001$); CT x AI ($r = -0.7473$, $p =0.0331$); IDF x AI ($r= -0.7590$, $p=0.0007$).

Para este estudio, la correlación negativa más alta de la fibra dietaria insoluble se calculó para VLDL (Figura 2). El índice aterogénico, un predictor significativo de aterosclerosis, también fue influenciado por la restricción de agua durante la producción de frijol. El frijol 100/50 exhibió la mayor protección entre los tratamientos restantes, y no fue estadísticamente diferente del control sano, mientras que su valor de índice aterogénico fue 71% menor que el calculado a partir del grupo control obeso (Tabla 2). Las ratas obesas desarrollaron dislipidemia, caracterizada por un aumento de los triglicéridos séricos, colesterol, LDL y VLDL, y una disminución del HDL sérico. La consecuencia de esta disfunción fisiológica es un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis. La Figura 2 muestra que la fibra insoluble y los taninos condensados tienen una gran influencia en esta variable de respuesta.

CONCLUSIONES

La restricción hídrica durante la etapa reproductiva (100/50) de las plantas de frijol común permitió cosechar frijoles con mayor potencial antiobesogénico. El aumento del efecto hipolipidémico se asoció con fitoquímicos acumulados en mayor concentración en el grano de frijol obtenido bajo estas plantas. En general, el cultivo de frijol bajo riego deficitario podría ser una herramienta agronómica para mejorar la calidad funcional de esta leguminosa.

REFERENCIAS

- Acosta-Gallegos JA, Montero-Tavera V, Jiménez-Hernández Y, Anaya-López JL, Gonzalez-Chavira MM. (2014). 'Dalia', nueva variedad de frijol de grano tipo Flor de Junio para la región centro de México. Rev. Mexicana Cienc. Agric., 5:331-6. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v5n2/v5n2a14.pdf>.
- de Lima SLS, Gomes MJC, da Silva BP, Alves NEG, Toledo RCL, Theodoro JMV. (2019). Whole flour and protein hydrolysate from common beans reduce the inflammation in BALB/c mice fed with high fat high cholesterol diet. Int. Food Res. J., 122:330–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.013>.
- Deshpande SS & Cheryan M. (1985). Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. J. Food Sci., 50: 905-910. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12977.x>
- Fereres E & Soriano MA. (2007). Deficit irrigation for reducing agricultural water use. J. Exp. Bot., 58, 147–159. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl165>.
- Figueroa-Pérez MG, Rocha-Guzmán NE, Pérez-Ramírez IF, Mercado-Silva E, Reynoso-Camacho R. (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (*Mentha*

CONCLUSIONS

Water restriction during the reproductive stage (100/50) of common bean plants allowed harvesting beans with greater anti-obesogenic potential. The increase in the hypolipidemic effect was associated with phytochemicals accumulated in higher concentrations in the bean grain obtained under these plants. In general, growing beans under deficit irrigation could be an agronomic tool to improve the functional quality of this legume.

- piperita*) grown under drought stress. J. Agric. Food Sci., 62:12027–12033. <https://doi.org/10.1021/jf503628c>
- Geerts S & Raes D. (2009). Deficit irrigation as an on-farm strategy to maximize crop water productivity in dry areas. Agric. Water Manag., 96, 1275–1284. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.04.009>
- González de Mejía E, Martínez-Resendiz V, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G. (2003). Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and *in vitro* protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. J. Sci. Food Agric., 83, 1022–1030. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1439>
- Herrera MD, Reynoso-Camacho R, Melero-Meraz V, Guzmán-Maldonado SH, Acosta-Gallegos JA. (2021). Impact of soil moisture on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) phytochemicals. J. Food Compos. Anal. 99:103883. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103883>
- Hiai S, Oura H, Nakajima T. (1976). Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid. Planta Med., 29: 116-122. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097639>
- Horwitz W, Senzel A, Reynolds H, Park DL. (1975). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Ed. 12.
- Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, Liu RH. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J. Agric. Food Chem., 50, 2926-2930. <https://doi.org/10.1021/jf0111209>
- Mendoza-Sánchez M, Guevara-González RG, Castaño-Tostado E, Mercado-Silva EM, Acosta-Gallegos JA, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R. (2016). Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. Food Chem., 212,128-37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.110>
- Nansseu JRN, Moor VJA, Nouaga MED, Zing-Awona B, Tchanana G, Ketcha A. (2016). Atherogenic index of plasma and risk of cardiovascular disease among Cameroonian postmenopausal women. Lipids Health Dis., 15:1-5. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0222>
- Nasrollahi V, Mirzaie-asl A, Piri K, Nazeri S, Mehrabi R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). Phytochemistry, 103:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.004>
- Nolan R, Shannon OM, Robinson N, Joel A, Houghton D, Malcomson FC. (2020). It's no has bean: a review of the effects of white kidney bean extract on body composition and metabolic health. Nutrients, 2020, 12. <https://doi.org/10.3390/nu12051398>.
- Salas-Lumbreras GC, Reveles-Torres LR, Servin-Palestina M, Acosta-Gallegos JA, Herrera MD, Reyes-Estrada CA, López JA. (2022). Common bean seeds obtained by plant water restriction ameliorates obesity-associated cardiovascular risk and insulin resistance. Plant Foods Hum. Nutr., 78, 38-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-022-01019-5>.
- Saura-Calixto F, Goñi I, Bravo L, Mañas E. (1993). Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. J. Food Sci., 58: 642–643. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04346.x>
- Sharma T & Kanwar SS. (2018). Phytomolecules for obesity and body weight management. J. Biochem. Cell Biol., 1, 1–8. <https://www.omicsonline.org/open-access/phytomolecules-for-obesity-and-body-weight-management-97605.html>.
- Singleton VL & Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic., 16, 144–153. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.full.pdf+html>
- Sun Y, Wang Y, Song P, Wang H, Xu N, Wang Y, Zhang Z, Yue P, Gao X. (2019). Anti-obesity effects of instant fermented teas *in vitro* and in mice with high-fat-diet-induced obesity. Food Funct., 10,3502–3513. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.032>
- Thomas J R. (2014). Improved data reporting in RQES: From Volumes 49, 59, to 84. Res. Q. Exerc. Sport, 85, 446–448. <https://doi.org/10.1080/02701367.2014.962437>
- Viguiouk E, Blanco Mejia S, Kendall CW, Sevenpiper JL. (2017). Can pulses play a role in improving cardiometabolic health? Evidence from systematic reviews and meta-analyses. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1392, 43-57. <https://doi.org/10.1111/nyas.13312>.
- Xu BJ & Chang SKC. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. J. Food Sci., 2, 159-166. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Zheng M, Meng Y, Zhou Z, Wang Y, Chen B. (2014). Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to drought stress and recovery. Proteomics, 14,1776–1995. <https://doi.org/10.1002/pmic.201301023>.
- Zhu W. (2014). Facing a fast-changing world with ‘no change.’ Res. Q. Exerc. Sport, 85, 427–428. <https://doi.org/10.1080/02701367.2014.965550>.