



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Producción de germinados de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) con actividad  
antioxidante mejorada a través de inducción química”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y  
Tecnología de Alimentos

PRESENTA

I.B.Q. Diana Elizabeth Escobedo Álvarez

DIRIGIDA POR:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Santiago de Querétaro, Querétaro, Enero 2018



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Producción de germinados de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) con actividad antioxidante mejorada a través de inducción química”.

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

IBQ. Diana Elizabeth Escobedo Álvarez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**SINODALES**

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Presidente

  
Firma

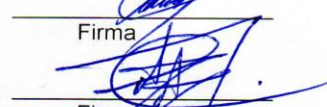
Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Secretario

  
Firma

Dr. Rosalía Reynoso Camacho  
Vocal

  
Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

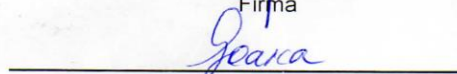
  
Firma

M.C. Magdalena Mendoza Sánchez  
Suplente

  
Firma



MSP Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Enero, 2018  
México

## ABSTRACT

Oxidative stress is a natural process of aerobic organisms that can increase during various pathologies. It is known that different compounds present in foods such as chickpea contribute to decrease oxidative stress in different ways, including the induction of cellular antioxidant response pathways. In this work we first evaluated the effect of chemical induction with different elicitors: salicylic acid (SA, 1 and 2 mM), chitosan (QN, 3.3 and 7  $\mu$ M), as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 and 30 mM) during sprouting of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Blanoro, Patrón and San Antonio; in order to increase the content of bioactive compounds and decrease the content of antinutritional compounds. For this purpose, samples of chickpea cultivars were daily sprayed with inducer solutions for 4 days in a sprouting chamber with the following conditions: darkness; temperature, 25 °C; humidity, 70%. The highest increase of both bioactive compounds (phenolic and saponins) was found in Blanoro cultivar induced with SA 2 mM; whereas the highest phytosterol content was detected in San Antonio cultivar induced with QN 7  $\mu$ M. Interestingly, Blanoro cultivar induced with SA 2 mM achieved 62 and 34% decreases in lectin and trypsin inhibitors contents; whereas, treatments with 1 mM AS and QN 7  $\mu$ M decreased phytic acid content up to 49%. Therefore, the antioxidant activity of Blanoro cultivar extracts from both induced and non-chemically induced sprouts was evaluated in Hepa1c1c7 cells. No significant increases in glutathione-S-transferase (GST) activity and reduced glutathione (GSH) levels were observed in Hepa1c1c7 cells incubated with the both extracts. Interestingly, an increase in the activity of NQO1 (inducing potency) up to 97% was observed in cells incubated with 100 mg/mL of extracts compared to control cells without extract; however, no difference was observed between the chemically induced and the non-induced sprout extracts. Although the germination process increased the inducing potency of Blanoro cultivar sprout extracts, the modification in the profile of bioactive compounds obtained after chemical induction did not improve the antioxidant activity of chickpea sprouts, under the germination conditions tested in our study. Therefore, further studies are necessary to improve the biological activity of chickpea sprouts.

### Keywords:

***Cicer arietinum* L., sprouts, antioxidant activity, reduced glutathione, glutathione-S-transferase, quinone oxidoreductase**

## RESUMEN

El estrés oxidativo es un proceso natural de los organismos aerobios que puede incrementarse durante diversas patologías. Se sabe que diferentes compuestos fitoquímicos presentes en alimentos como el garbanzo contribuyen a disminuir el estrés oxidativo de diferentes maneras, entre ellas, la inducción de la respuesta antioxidante. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó primeramente el efecto de la aplicación de diferentes elicitores: ácido salicílico (AS; 1 y 2 mM), quitosano (QN; 3.3 y 7  $\mu$ M) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 y 30 mM) durante la germinación de diferentes cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.): Blanoro, Patrón y San Antonio, con el objetivo de incrementar el contenido de compuestos bioactivos con actividad inductora de sistemas antioxidantes y, a su vez, disminuir el contenido de compuestos antinutricios. Para lo anterior, los tres cultivares de garbanzo se asperjaron diariamente con soluciones de los inductores mencionados durante 4 días en oscuridad dentro de una cámara de germinación (temperatura, 25 °C; humedad, 70%). El mayor aumento de compuestos bioactivos se encontró en el cultivar Blanoro inducido con AS 2 mM en relación al contenido de compuestos fenólicos y saponinas; mientras que, el cultivar San Antonio inducido con QN 7  $\mu$ M únicamente aumentó el contenido de fitoesteroles. Asimismo, el tratamiento con AS 2 mM disminuyó en un 62% y 34% los contenidos de lectinas e inhibidores de tripsina en el cultivar Blanoro, respectivamente; mientras que, los tratamientos de AS 1 mM y QN 7  $\mu$ M disminuyeron hasta un 49% el contenido del ácido fítico. Posteriormente, en células hepa1c1c7 se evaluó la actividad antioxidante de extractos de germinados (10-100 mg/mL) inducidos químicamente y sus controles, mediante la determinación de las enzimas de fase 2 como glutatión-S-transferasa (GST), quinona oxidoreductasa (NQO1) y niveles de glutatión reducido (GSH), encontrándose un incremento de hasta un 97% en la actividad de NQO1 (potencia inductora) en las células incubadas con 100 mg/mL de extractos, respecto a las células control sin extracto; sin embargo, no se observó diferencia en la potencia inductora entre el extracto de germinado inducido y del no inducido químicamente. Si bien, se obtuvo una modificación en el perfil de compuestos bioactivos, la inducción química no incrementó/potenció la actividad biológica en los germinados. Por lo tanto, se confirma que la germinación aumenta la potencia inductora independientemente de la aplicación de inductores químicos; sin embargo, se sugiere la optimización de las condiciones de germinación que potencien significativamente la actividad antioxidante de los extractos de garbanzo.

### Palabras clave:

***Cicer arietinum* L., germinados, actividad antioxidante, glutatión reducido, glutatión-S-transferasa, quinona oxidoreductasa**

***“Señor, ayúdame a hacer lo grandioso como si fuera algo pequeño, ya que lo hago con tu poder; y lo pequeño como si fuera algo grandioso, ya que lo hago en tu nombre” Blaise Pascal***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Minerva Ramos por aceptarme en su grupo de trabajo, por su paciencia y dirección hacia mi persona.

A los miembros de mi comité Dra. Rosalía Reynoso y Dr. Ramón Guevara por brindarme la facilidad de trabajar en sus instalaciones; al Dr. Eduardo Castaño por contribuir a un mejor análisis del proyecto.

A la ya “casi” Dra. Magdalena Mendoza por su dirección y apoyo que trascendió más allá de lo profesional.

A la Ing. Cecilia Villanueva y a los jóvenes del campus Amazcala (de quienes olvidé sus nombres mas no su ayuda en mis experimentos) por su disponibilidad para llevar a cabo la primera fase del proyecto.

A la M.C. Adriana Chico por las facilidades y apoyo brindadas en la realización de diferentes experimentos en su laboratorio.

A la Dra. Iza Pérez por la realización de gran parte de los análisis de fitoquímicos.

A todo el personal administrativo del PROPAC, principalmente a a la Sra. Carmelita Campos por su apoyo, aun antes del ingreso al programa.

A mis compañeros de laboratorio: Lily, Adri, Itzel, Lupita, Delia, Beto, América y al Dr. Alberto, por cada una de sus muestras de apoyo y, porque sin dudarlo puedo decir que cada uno contribuyó a que este proyecto pudiera concluirse. Más allá de esto, el compañerismo día a día hizo más llevadero el arduo trabajo y sus consejos siempre fueron de gran utilidad.

A la familia Yáñez por la hospitalidad que me brindaron.

A mis padres y a mis hermanos, porque sé que, aunque lejos físicamente, su apoyo siempre estuvo presente de muchas formas. Por confiar en mí e impulsarme a ser siempre una mejor persona.

A Carlos, por su apoyo incondicional, por motivarme día a día a seguir adelante y por soportar estos últimos “complicados” meses.

A Dios, Creador y Dador de vida, por permitirme conocer a cada una de estas personas y por mantenerte siempre a mi lado.

*“Y si le dan siquiera un vaso de agua fresca a uno de mis seguidores más insignificantes, les aseguro que recibirán una recompensa”. Mateo 10:42*

## ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	3
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	
2.1. Estrés oxidativo	
2.1.1. Oxidantes y antioxidantes	15
2.1.2. Mecanismos de respuesta antioxidante	15
2.2. Garbanzo ( <i>Cicer arietinum</i> L.)	17
2.2.1. Producción de leguminosas en México	17
2.2.2. Procesos que mejoran la composición nutracéutica de leguminosas	18
2.2.2.1. Germinación	18
2.2.2.2. Cambios fitoquímicos durante el proceso de germinación	18
2.2.2.3. Inducción química de germinados	20
2.2.2.4. Beneficios a la salud por consumo de germinados	24
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
V. METODOLOGÍA	
5.1 Material biológico y componentes químicos	28
5.2 Soluciones de inducción	28
5.3 Condiciones experimentales de germinación	29
5.4 Porcentaje de germinación y longitud radicular	29
5.5 Análisis nutricional de los germinados	30



5.6 Determinación de los componentes antinutricios de los germinados	31
5.6.1 Actividad del inhibidor de tripsina	31
5.6.2 Determinación de lectinas	32
5.6.3 Cuantificación de ácido fítico	32
5.7 Análisis nutracéutico de los germinados	
5.7.1 Perfil fitoquímico mediante HPLC	33
5.8 Análisis en células Hepa1c1c7	
5.8.1 Cultivo celular	34
5.8.2 Tratamientos	35
5.8.3 Viabilidad celular (prueba MTT)	35
5.8.4 Ensayos de actividad antioxidante	36
5.8.4.1 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)	36
5.8.4.2 Evaluación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST)	37
5.8.4.3 Evaluación de la actividad de quinona reductasa (NQO1): potencia inductora	38
5.8.4.4 Cuantificación de proteína por BCA	39
5.9 Análisis estadístico	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. Parámetros agronómicos de los germinados de garbanzo inducidos químicamente	40
6.2. Contenidos totales de fitoquímicos en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente	43
6.3. Identificación y cuantificación de compuestos fitoquímicos en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente	46
6.4 Determinación de los componentes antinutricios de losgerminados de garbanzo inducidos químicamente	61

6.5 Análisis nutricional de los germinados	63
6.6 Actividad antioxidante mejorada de germinados de garbanzo a través de inducción química en células Hepa1c1c7	66
6.6.1 Viabilidad celular	67
6.6.2 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre los niveles de GSH en células Hepa1c1c7	68
6.6.3 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre la actividad enzimática de GST en células Hepa1c1c	69
6.6.4 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre la actividad enzimática de NQO1 en células Hepa1c1c7: POTENCIA INDUCTORA	71
VII. CONCLUSIONES	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXO 1	82
ANEXO 2	82
ANEXO 3	83
ANEXO 4	83
ANEXO 5	83
ANEXO 6	83
ANEXO 7	84
ANEXO 8	84
ANEXO 9	85

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1	Extractos de diferentes germinados de garbanzo empleados a diferentes concentraciones en células Hepa1c1c7	35
2	Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente	52
3	Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente	53
4	Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente	54
5	Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente	56
6	Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente	56
7	Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente	57
8	Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente	58
9	Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente	59
10	Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Porcentaje de germinación en semillas de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente	41
2	Tamaño de radícula en semillas germinadas de diferentes variedades de garbanzo inducidas químicamente	42
3	Contenido de compuestos fenólicos totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente	43
4	Contenido de fitoesteroles totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente.	44
5	Contenido de saponinas totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente	45
6	Contenido de lectinas en germinados de garbanzo de diferentes cultivares inducidos químicamente	61
7	Contenido de inhibidores de tripsina en germinados de garbanzo de diferentes variedades inducidos químicamente	62
8	Contenido de ácido fítico en germinados de garbanzo de diferentes cultivares inducidos químicamente	63
9	Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante la prueba de MTT con diferentes extractos de germinados inducidos y no inducidos químicamente	67
10	Concentración de GSH en células incubadas con extractos de germinados de garbanzo	68
11	Actividad enzimática de GST en células incubadas con extractos de germinados de garbanzo	70
12	Actividad enzimática de NQO1 en células incubadas con extractos de germinados de garbanzo	71

## I. Introducción

El estrés oxidativo es un proceso natural de los organismos aerobios que ocurre durante el metabolismo de los mismos. Sin embargo, en diferentes situaciones, puede presentarse una exacerbada proporción de especies oxidantes, las cuales están relacionadas con diferentes patologías como el cáncer, diabetes, Alzheimer y algunas enfermedades autoinmunes.

De igual forma, se reconoce que diversos factores relacionados con la alimentación pueden incrementar el estrés oxidativo en el organismo, tales como dietas altas en grasas y carbohidratos, así como compuestos químicos presentes en los alimentos procesados.

Por otro lado, el contenido de diversos alimentos se ha relacionado con una disminución del estrés oxidativo; esto debido a la cantidad de compuestos bioactivos que poseen dichos alimentos. Destacan en esta cualidad las leguminosas, dentro de las que podemos encontrar al garbanzo (*Cicer arietinum* L.), el cual es un alimento que destaca por su alto contenido de proteína y fibra; adicional a esto, el garbanzo es rico en compuestos fenólicos y esteroides. Algunos de estos compuestos mencionados se han relacionado precisamente con una disminución del estrés oxidativo en diferentes modelos de estudio.

En diversas investigaciones se han realizado propuestas de mejora tecnológica en materiales como semillas de diferentes plantas, incluyendo a las leguminosas. Una de las más accesibles es la germinación, la cual, como proceso natural de desarrollo de la semilla, es relativamente económica y fácil de llevar a cabo. Además, las investigaciones realizadas durante la germinación de diferentes semillas muestran una mejor disponibilidad de nutrientes, así como un contenido más alto de compuestos bioactivos presentes en los germinados con respecto a las semillas crudas. Aunado a lo anterior, se tiene la inducción química en las semillas. En este proceso, que también es de fácil acceso y relativamente bajo costo, las semillas son sometidas a estrés químico por un período de tiempo breve

durante el cual se activan vías de defensa antioxidante, incrementando con ello el contenido de compuestos bioactivos ya presentes en la semilla de manera natural.

Si bien se conoce del contenido de compuestos bioactivos presentes en materiales como el garbanzo y se proponen estrategias para incrementar el contenido de los compuestos ya presentes, es de suma importancia corroborar el efecto biológico en la disminución del estrés oxidativo mediante la inducción de sistemas antioxidantes. Para lo anterior, se prepararon extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de los germinados de garbanzo elicitados con ácido salicílico (AS), quitosano (QN) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con el objetivo de evaluar su potencial para inducir enzimas antioxidantes en células hepáticas de ratón Hepa1c1c7.

## **II. Antecedentes**

### **2.1. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo surge de un desbalance entre las moléculas oxidantes y antioxidantes, produciéndose una mayor cantidad de las primeras (Sies, 1997). Las moléculas oxidantes se producen de manera natural durante el metabolismo aeróbico de los organismos (Sies, 1997); muchos organismos pluricelulares utilizan incluso estas moléculas oxidantes, las cuales tienden a ser reactivas, para protección contra agentes patógenos y como activación de diferentes vías de señalización (Lyakhovich *et al.*, 2006)

#### **2.2.1. Oxidantes y antioxidantes**

Entre las especies oxidantes más comunes se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ERO) que incluyen el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), entre otras, y las especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Estas especies se forman como resultado del metabolismo de la célula o como resultado de alguna exposición a una sustancia tóxica o daño patológico (Ma, 2013).

Las ERO y ERN son neutralizadas comúnmente por una serie de complejos sistemas antioxidantes que mantienen la homeostasis celular; entre los principales destacan moléculas de bajo peso molecular como el glutatión reducido (GSH) y las vitaminas C y E; proteínas no catalíticas como tioredoxina (Trx) y glutarredoxina (Grx); además, también participan enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras (Ma, 2013).

#### **2.1.2. Mecanismos de respuesta antioxidante**

Un compuesto puede ejercer acción antioxidante mediante la inhibición de la generación de ERO, mediante la captura de radicales libres (RL) o por disminución y remoción de iones metálicos. Por otro lado, se sabe que bajo ciertos estímulos

se potencian las defensas antioxidantes endógenas a través de una expresión aumentada de genes que codifican la transcripción de enzimas antioxidantes y de detoxificación (Silva & Coutinho, 2010).

El factor de transcripción nuclear 2 relacionado al factor nuclear eritroide (Nrf2) funciona como “receptor activado por xenobióticos” para regular la respuesta adaptativa a oxidantes y electrófilos. Se encontró que Nrf2 regula de manera coordinada la transcripción de una serie de enzimas que detoxifican xenobióticos como la glutatión-S-transferasa (GST) y la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1), mediante antioxidantes y electrófilos (Ma, 2013).

Existe una gran variedad de moléculas, incluyendo fitoquímicos y sus derivados (sulfurofano y metil-bardoxolona), terapéuticas (oltipraz), agentes ambientales (arsénico) y químicos endógenos (NO), que inducen la transcripción de genes de respuesta antioxidante mediante la activación de Nrf2. Estos inductores son muy diferentes en estructura y propiedades; sin embargo, se ha identificado que comparten su habilidad para modificar grupos sulfhidrilos (-SH) de una manera similar para potenciar la inducción de NQO1 (Ma, 2013).



## **2.2. Garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es un cultivo importante, especialmente en los países de Asia y África. Esta leguminosa se considera una buena fuente de hidratos de carbono y proteínas de mejor calidad que otras; tiene cantidades significativas de todos los aminoácidos esenciales, excepto los que contienen azufre, los cuales se pueden complementar mediante la adición de cereales a la dieta diaria. El almidón es el carbohidrato principal de almacenamiento, seguido de fibra dietética, oligosacáridos y azúcares simples como glucosa y sacarosa (Jukanti *et al.*, 2012).

Aunque los lípidos están presentes en cantidades bajas, el garbanzo es rico en ácidos grasos nutricionalmente importantes como el linoleico y oleico. El  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol, son esteroides importantes presentes en el aceite de garbanzo. Minerales como el Ca, Mg, P y, sobre todo, K también están presentes en las semillas de garbanzo.

El garbanzo es una buena fuente de vitaminas importantes como la riboflavina, niacina, tiamina, ácido fólico y vitamina A (Jukanti *et al.*, 2012).

### **2.2.1. Producción de leguminosas en México**

El cultivo de leguminosas en México constituye una proporción importante de la producción agrícola del país. En lo referente al cultivo de garbanzo grano, en el año 2014 se contó con una producción anual de 171,665.46 toneladas, obtenidas de estados como Sinaloa, Sonora y Guanajuato, principalmente (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, 2014). Estos datos indican que la producción agrícola del cultivo mencionado es suficiente en cuanto a volumen en caso de ser utilizado como alimento funcional, basado en sus contenidos de nutrientes.

## **2.2.2. Procesos que mejoran la composición nutracéutica de leguminosas**

### **2.2.2.1. Germinación**

La germinación de la semilla se define como el conjunto de fenómenos mediante los cuales el embrión dentro de la semilla pasa de un estado latente a un estado activo. El proceso de germinación está constituido por varias fases: absorción de agua o imbibición; activación del metabolismo y proceso de respiración (síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva), elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula (Nonogaki *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, en las leguminosas se pueden encontrar diversos fitoquímicos; aunado a lo anterior, numerosos estudios encontraron que los perfiles nutricional y químico se modificaron después de la germinación. Algunos cambios significativos ocurrieron en los almidones que fueron degradados a azúcares simples por las amilasas. Los cambios en la degradación del almidón dependieron de diferentes condiciones de germinación, como la temperatura, la humedad, el tiempo de remojo, el medio de cultivo, entre otros (Donkor *et al.*, 2012).

### **2.2.2.2. Cambios fitoquímicos durante el proceso de germinación**

Diversos estudios demostraron que el proceso de la germinación puede potenciar el valor nutricional y las características funcionales en diferentes semillas; lo anterior se muestra con la disminución de algunos factores antinutricios durante el proceso, además de mejorar la calidad de compuestos bioactivos e incrementar el contenido de proteínas, aminoácidos, carbohidratos y vitaminas (Singh & Sharma, 2015).

En estudios con germinados de diferentes variedades de arroz integral se observó un incremento el contenido de ácido  $\gamma$ -aminobutírico y fenoles totales en el cuarto día de germinación (Cáceres *et al.*, 2014). Al elaborar panes con harina de arroz pardo germinado se encontró un alto contenido de proteína, lípidos y compuestos bioactivos (ácido  $\gamma$ -aminobutírico y polifenoles), además de la reducción en el contenido de ácido fítico y del índice glicémico (Cornejo *et al.*, 2015).

Guajardo-Flores y colaboradores (2012) estudiaron germinados de frijol negro durante cinco días, encontrando que después de un día de germinación el contenido total de soyasaponina incrementó 1.9 veces y continuó aumentando durante el segundo y tercer días; la presencia de genisteína se detectó hasta el tercer día de la germinación.

Por otro lado, la germinación en garbanzo redujo el contenido de ácido fítico, estaquiosa y rafinosa, además de mantener altos los contenidos de lisina, isoleucina y aminoácidos aromáticos; aunado a lo anterior, durante el proceso se retuvieron más minerales y vitamina B, en comparación con diversos procesos de cocción (El-Adawy, 2002). Khalil y colaboradores (2007) compararon la germinación de garbanzo tanto de variedades kabuli (pigmentadas) como variedades desi (no pigmentadas) y encontraron una disminución del 73% en el contenido de ácido fítico en variedades kabuli; mientras que, en variedades desi se logró una disminución del 32%. En el caso de los compuestos bioactivos presentes en el garbanzo se incrementó en al menos un 53.7% el contenido de compuestos fenólicos totales en el garbanzo germinado (Tarzi *et al.*, 2012).

Las investigaciones anterior sugieren que el proceso de germinación favorece en gran manera el contenido nutrimental y nutracéutico de las semillas, por lo que el optimizar las condiciones de germinación ayudará a la obtención y producción de germinados de mejor calidad.

### **2.2.2.3. Inducción química de germinados**

Los elicitores son sustancias químicas o biofactores provenientes de diversas fuentes que pueden inducir cambios fisiológicos en los organismos vivos.

En un sentido amplio, los elicitores, en plantas, se refieren a sustancias químicas de varias fuentes que pueden desencadenar respuestas fisiológicas y morfológicas, así como una acumulación de fitoalexinas. En este aspecto pueden incluirse elicitores abióticos, como iones metálicos y compuestos inorgánicos; o elicitores bióticos provenientes de hongos, bacterias, virus o herbívoros, componentes de la pared celular vegetal, así como los productos químicos que se liberan en las plantas atacadas por patógenos o herbívoros (Zhao *et al.*, 2005).

El proceso celular general y principio regulador para la activación de la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas es que, una señal extracelular o intracelular es percibida por un receptor en la superficie de la membrana plasmática o endomembranas; la percepción de la señal inicia una red de transducción de señales que conduce a la activación o la síntesis de *ново* de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo secundario de la planta. Así, las enzimas resultantes catalizan la biosíntesis de metabolitos secundarios como una medida de defensa de la planta (Sato *et al.*, 2001).

Existe un extenso repertorio de metabolitos secundarios presentes en concentraciones variables en todos los tejidos vegetales adultos, cuya función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas. A diferencia de las fitoalexinas, estos compuestos se caracterizan por su estado permanente y tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta o la de inhibir la germinación de esporas. Por tanto, pueden ejercer una presión selectiva sobre los patógenos potenciales (Vivanco *et al.*, 2005).

La resistencia inducida (IR) en plantas es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998). De forma similar, el efecto de IR promovido por elicitores se ha evaluado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Entre los elicitores comúnmente usados en la inducción de resistencia para el control de enfermedades se encuentran el ácido salicílico (AS), el quitosano (QN), el metil jasmonato (JM) y acibenzolar-S, un análogo del AS que se asocia con la acumulación de AS y proteínas relacionadas a patogénesis (PRP) (Zhao *et al.*, 2005).

El AS es una fitohormona ubicua en plantas que genera un impacto significativo sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, fotosíntesis, transpiración, intercambio iónico y transporte de electrones, así como cambios específicos en la anatomía de las plantas, hojas y en la estructura del cloroplasto. Además de lo anterior, el AS es una molécula de señalización endógena que media el mecanismo de defensa de la planta contra patógenos e induce la producción y acumulación de proteínas relacionadas a patogénesis que están involucradas en la inducción de resistencia (Álvarez, 2000; Darby *et al.*, 2000).

El QN es un polisacárido lineal compuesto de cadenas  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas aleatoriamente. Esta molécula tiene potencial uso en la agricultura en lo que concierne al control de enfermedades de plantas debido a que se ha mostrado que inhibe el crecimiento y toxicidad de hongos. Además, se observó que activa la respuesta de defensa en plantas contra virus y bacterias; aumentando la acumulación de fitoalexinas y PRP en la planta (El-Hadrami *et al.*, 2010).

Vasyukova y colaboradores (2001) mostraron que el QN soluble en agua a una

concentración de 1000 µg/mL indujo resistencia sistémica y local en papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) a *Phytophthora infestans* y nematodos, respectivamente. También mostraron que el QN indujo la acumulación de fitoalexinas en el tejido de la planta hospedera, además de estimular la generación de ERO. La activación del mecanismo de protección en el tejido de la planta inhibió el crecimiento de diferentes patógenos como el *Oomicetes Phytophthora infestans* y el nematodo de raíz *Meloidogyne incognita*.

Uno de los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas es la utilización y modificación del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) para convertirlo en derivados con un alto grado de toxicidad (por ejemplo, ERO) hacia microorganismos potencialmente patógenos (Pineda & Gloria, 2004).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce como una de las primeras respuestas del sistema de defensa de las plantas, para conseguir resistencia o tolerancia a diferentes tipos de estrés, debido a que interviene en la activación o inactivación de proteínas involucradas en la transducción de señales para la expresión de genes relacionados con la tolerancia a estrés de tipo oxidativo, hídrico, y estrés derivado de patógenos (Orozco *et al.*, 2001; Apel & Hirt, 2004). Además, se sabe que durante una interacción compatible entre planta-patógeno, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementan dramáticamente, al igual que las respuestas de defensa estructurales, en donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como cofactor para reforzar la pared celular a través de uniones cruzadas de polímeros, lo cual hace posible el endurecimiento y, por lo tanto, impide la penetración y proliferación de los patógenos (Camarena & de la Torre, 2007; Fones & Preston, 2011).

En algunos estudios se emplearon diferentes elicitores en germinados de varias especies. Baenas y colaboradores (2014) utilizaron las fitohormonas JM (25 µM), ácido jasmónico (150 µM) y AS (100 µM), así como glucosa (277 mM), sacarosa (146 mM) y el aminoácido L-metionina (5 mM), encontrando que el JM, el ácido jasmónico y los azúcares, incrementaron el contenido de glucosinolatos como

glucorafananina en los germinados. Estos compuestos muestran propiedades anticancerígenas y actividad citotóxica/apoptótica selectiva en líneas celulares de cáncer de colon.

En germinados de lentejas se aplicaron 500 mM de ácido ascórbico, 50 mM de ácido fólico, 5 mM de ácido glutámico y 50 ppm de QN en 5 mM de ácido glutámico como una estrategia para aumentar la tasa de germinación y para mejorar la acumulación de ácido y aminobutírico (GABA) y compuestos fenólicos (Peñas *et al.*, 2015). Se observó que la aplicación de elicitores no afectó negativamente al rendimiento de germinación de lentejas y no hubo cambios significativos en el patrón de proteínas de lentejas germinadas en presencia de inductores. Aunado a lo anterior, el tratamiento de QN/ácido glutámico aumentó en 1.6 veces el contenido de GABA; mientras que, los ácidos ascórbico y fólico, así como la mezcla QN/ácido glutámico, incrementaron 3.6-3.9 mg equivalentes de ácido gálico/g (Peñas *et al.*, 2015).

Por su parte, Świeca (2015) evaluó las condiciones en lentejas para la elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentraciones 15 y 150 mM asperjadas en sólo un paso o de manera continua). En general, la elicitación aumentó el contenido fenólico (en relación con el control), con la concentración más alta (3.2 veces) a los cinco días de edad (15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). También se indujeron las actividades de las enzimas tirosina y fenilalanina amonio-liasa (PAL), así como la actividad de la CAT a los dos días de edad en germinados de lentejas tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 mM.

Con respecto a las semillas bajo estudio, se investigó la influencia de diferentes condiciones de germinación en el contenido de isoflavonas en garbanzo, incluyendo la germinación en la oscuridad (GD), a la luz (GL), bajo estrés etanólico (GE), o bajo estrés salino en la oscuridad (GS). Se obtuvo la máxima cantidad de isoflavonas totales en el grupo GL en el día 8. El contenido de formononetina y biocanina A en este grupo fueron 154 y 130 veces mayores, respectivamente, que en las semillas no tratadas; por el contrario, el contenido de genisteína disminuyó

con la germinación. Los compuestos ononina, pseudobaptigenina y el glucósido gliciteín acetilado solamente se detectaron en los garbanzos germinados (Gao *et al.*, 2015).

De acuerdo a los estudios mencionados, tanto la germinación como la inducción química mediante elicitores de diversa naturaleza, son procedimientos que mejoran la calidad nutricional y las cantidades de compuestos bioactivos en cereales, leguminosas y otras plantas. Por lo tanto, es necesario evaluar sustancias químicas que sean asimilables por las plantas, además de ser económicamente accesibles, que propicien los resultados mencionados anteriormente.

#### **2.2.2.4. Beneficios a la salud por consumo de germinados**

Mao y colaboradores (2008) alimentaron ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) con germinados de garbanzo incubados en presencia de 200, 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$  de ortovanadato de sodio (VCS), debido a que algunos compuestos de vanadio mostraron efectos hipoglucemiantes. Se estudiaron los efectos de la alimentación con germinados durante 8 semanas, encontrando que el grupo alimentado con germinado incubado a 100  $\mu\text{g/mL}$  de VCS redujo significativamente su nivel de glucosa en sangre de 396 a 154  $\text{mg/dL}$ .

En un estudio con ratas diabéticas inducidas con STZ se administraron diversos extractos de germinados de alfalfa durante cuatro semanas, observándose una reducción en la concentración de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), comparándolas con el grupo al cual se le administró un fármaco utilizado para disminuir lípidos en sangre (rosuvastatina). En los germinados se identificaron compuestos como:  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol de la fracción de éter de petróleo; 10-hidroxi-coumestrol, apigenina, genisteína, ácido p-hidroxi-benzoico, 7,4'-dihidroxi-flavona, quercetin-3-glucósido y sissotrina de la fracción de etil acetato (Seida *et al.*, 2015).



Gao y colaboradores (2015) incubaron adipocitos con extractos de isoflavonas provenientes tanto de germinados como de semillas de garbanzo (100 y 50 µg/mL de germinado y 100 y 50 µg/mL de semilla) y observaron que el contenido intracelular de lípidos disminuyó un 21.7, 18.1, 20.6 y 17.8%, respectivamente; de manera similar, el contenido de triglicéridos disminuyó en un 17.4, 23.4, 21.1 y 25.5%, respectivamente, comparado con el contenido en adipocitos incubados con el control sin germinar.

La suplementación a pacientes diabéticos tipo 2 con 10 g/día de polvo de germinados de brócoli con alto contenido de sulforafano (~22.5 µmol/g) redujo la concentración de malondialdehído (MDA), un indicador de peroxidación lipídica, y los niveles de LDL. Por otro lado, la administración de 100-200 mg de germinados de brócoli deshidratados/kg de peso en ratas durante 20 días disminuyó el contenido de MDA en suero y en mitocondrias de hígado y riñón en animales tratados (Cho *et al.*, 2006; Bahadoran *et al.*, 2013).

En germinados de brócoli se han identificado diversos compuestos bioactivos, especialmente sulforafano. En condiciones de hiperglucemia y estrés oxidativo, el sulforafano tiene el potencial de activar la vía de señalización relacionada con el factor Nrf2 para la inducción a nivel transcripcional enzimas de fase 2 de detoxificación, así como enzimas y proteínas antioxidantes, en células endoteliales y aórticas, las cuales atenúan el estrés oxidativo e inactivan al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células beta activadas (NF-κB), un modulador clave de las vías inflamatorias (Bahadoran *et al.*, 2013).

En general, los estudios anteriormente mencionados indican que el efecto potencial del consumo de germinados elicitados con inductores químicos puede ser benéfico en la salud del consumidor, por lo que se deben optimizar tanto las concentraciones como el tipo de elicitors aplicados para obtener productos de mejor calidad nutrimental y nutracéutica.

### III. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el estrés oxidativo es un proceso natural propio de los organismos aerobios, el cual puede aumentar en diversas condiciones y provocar daños a la salud. También se conocen diversas sustancias conocidas como “antioxidantes” presentes en diversos alimentos, los cuales pueden disminuir este estrés oxidativo. Un grupo de estos alimentos son las leguminosas, de entre las que destacan el garbanzo, el cual se considera un alimento nutritivo y alto en su contenido de compuestos bioactivos.

Por otro lado, diversos estudios demuestran que el proceso de germinación, en conjunto con la inducción química, mejora la calidad nutrimental y nutracéutica de las semillas de cereales y leguminosas. Diversos elicitores se han utilizado con la finalidad de mejorar agrónomica y nutrimentalmente materiales vegetales, entre los cuales se encuentran el AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a que son sustancias económicas y fácilmente asimilables por las células vegetales.

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la aplicación de AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la germinación de semillas de garbanzo, así como el efecto de estos elicitores sobre el contenido de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y, finalmente, se evaluaron los efectos biológicos sobre la inducción de sistemas antioxidantes en un modelo *in vitro* de células hepáticas.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar los parámetros agronómicos, nutrimentales y nutracéuticos de germinados de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) inducidos químicamente con ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno, así como su efecto antioxidante en hepatocitos murinos.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Identificar los germinados de garbanzo inducidos químicamente con mejor perfil agronómico, nutrimental y nutracéutico.
- Evaluar el efecto antioxidante en células Hepac1c1c7 de germinados con los mejores perfiles agronómicos, nutrimentales y nutracéuticos.

## **V. METODOLOGÍA**

### **5.1 Material biológico y componentes químicos**

Se trabajó con tres diferentes cultivares de garbanzo: Patrón, Blanoro y San Antonio, provenientes del INIFAP campus Celaya.

Se utilizaron ácido salicílico (AS), quitosano (QN) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA) para la preparación de las soluciones de inducción.

Se utilizaron células Hepa1c1c7, las cuales se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células se mantuvieron en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA), bicarbonato de sodio (Baker, Xalostoc, Edo. de México), suero fetal bovino (FBS) al 10% (Microlab, México) y antibiótico (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA); además se empleó solución de tripsina-EDTA para la realización de las transferencias celulares (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

Se utilizó bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio, así como solución salina de fosfatos (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA) para el ensayo de viabilidad celular.

Para disolver los extractos de las harinas de los germinados se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5% (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).

### **5.2 Soluciones de inducción**

Las soluciones de inducción se eligieron de acuerdo a estudios previos realizados en el grupo de trabajo. Los inductores se disolvieron en agua destilada hasta obtener las siguientes concentraciones: QN (3.3 y 7  $\mu$ M), AS (1 y 2 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 y 30 mM).

### **5.3 Condiciones experimentales de germinación**

La germinación se llevó a cabo tomando en cuenta el método de Limón y colaboradores (2014). Primeramente, 50 g de cada una de las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (1.5%) en relación 1:6 peso-volumen durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se drenaron y lavaron con agua destilada hasta que el agua de lavado presentó un pH neutro.

Posteriormente, se sumergieron en agua (1:6 p/v) durante 24 h y se agitaron periódicamente. Finalmente, las semillas hidratadas se colocaron en charolas de germinación donde se cubrieron con papel filtro humedecido y se introdujeron en una cámara de germinación previamente esterilizada. Las condiciones a las que operó la cámara de germinación fueron 25 °C y 70% HR. La germinación se llevó a cabo en oscuridad durante 4 días hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas. Durante este periodo, el papel filtro se humedeció diariamente con agua o con las soluciones de inducción y se midió diariamente porcentaje de germinación y tamaño de radícula.

Al final del proceso, los germinados se deshidrataron en estufa a 60 °C, se pulverizaron y almacenaron, hasta el momento de su análisis químico.

### **5.4 Porcentaje de germinación y longitud radicular**

El porcentaje de germinación de las semillas se determinó diariamente hasta final del proceso de germinación. Este parámetro se obtiene con el número de semillas que germinaron entre el número de semillas totales por cien.

$$\% \text{ germinación} = \left[ \frac{\text{(número de semillas germinadas)}}{\text{(número total de semillas)}} \right] \times 100$$

La longitud radicular de los germinados se determinó a partir del segundo día del proceso y hasta el final del mismo. La medición se realizó con una regla desde el cuello del vástago hasta el meristema apical.

### **5.5 Análisis nutricional de los germinados**

Se realizó un análisis proximal por los métodos de la AOAC: humedad, 925.10; grasa, 920.85; cenizas, 923.03 y proteína, 920.87 de cada una de las harinas obtenidas de los germinados tratados mediante inducción, teniendo como controles al germinado con agua destilada y una harina de la semilla sin germinar.

## **5.6 Determinación de los componentes antinutricios de los germinados**

### **5.6.1 Actividad del inhibidor de tripsina**

La determinación de la actividad del inhibidor de tripsina se llevó a cabo mediante el método descrito por Kakade y colaboradores (1974) y modificado por Vidal-Valverde y colaboradores (2002). La técnica se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 µg/10 mL), y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual produce una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

A un gramo de la harina finamente molida se le adicionaron 50 mL de NaOH 0.01 N ajustando el pH a 9.6 y manteniendo en agitación por 2 h a 300 rpm. Posteriormente, se separó el sobrenadante y se realizaron diluciones hasta el punto en que 1 mL produce de 40 a 60% de inhibición. Se tomaron porciones del concentrado y diluciones de 0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL ajustando el volumen a 2 mL con agua destilada. A la solución se le agregaron 2 mL de una solución de tripsina (20 µg/mL) y se mantuvo a 37 °C por 10 min. Posteriormente, se agregó solución BAPNA. Esta reacción se llevó por espacio de 10 min y se detuvo con la adición de 1 mL de ácido acético al 30%. Finalmente, la absorbancia se midió a 410 nm.

Una unidad de tripsina (U.T.) se define de manera arbitraria como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm en 10 mL de mezcla de reacción (Kakade *et al.*, 1974). La actividad de inhibidores de tripsina se expresó en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.), por lo cual finalmente los resultados se expresaron como unidades inhibitorias de tripsina por mg de muestra seca.

### **5.6.1.2 Determinación de lectinas**

La determinación de lectinas se realizó mediante la técnica de actividad hemaglutinante de acuerdo al método previamente reportado por Le Berre-Anton y colaboradores (1997). En placas de 96 pozos se colocaron 25  $\mu$ L de diluciones seriadas 1:2 de los germinados y sus controles (1 mg/mL) y éstas se mezclaron a temperatura ambiente con solución salina estéril (NaCl al 9%), se adicionó una suspensión (1:1) de eritrocitos O Rh (+) al 5% (v/v), los cuales previamente se lavaron 3 veces en la misma solución. La hemaglutinación se evaluó 2 h después a temperatura ambiente utilizando un esteroscopio y se reporta como unidades de hemaglutinación por mg de proteína.

### **5.6.1.3 Cuantificación de ácido fítico**

El contenido de ácido fítico se determinó de acuerdo al método de Frühbeck (1995). Este método emplea una columna de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol que comúnmente se incluyen en otros métodos, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. La determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia a 500 nm, del complejo  $\text{FeCl}_3$ /ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe (III) con el ácido fítico.

Se pesó 1 g del germinado conteniendo menos de 5% de grasa y se le adicionaron 20 mL de HCl 2.4% (0.65 N) ajustando el pH a 1. Posteriormente, la mezcla se sometió a agitación vigorosa durante 2 h a temperatura ambiente. El extracto obtenido se centrifugó a 12,000 rpm a temperatura ambiente y se obtuvo el sobrenadante. A continuación se realizó un proceso de purificación por columna de intercambio iónico, para lo cual se tomó una alícuota de los sobrenadantes colectados y se diluyó con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión. Se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contengan 1% o más de ácido fítico, y la dilución de 5:25 en caso de contener menos, ajustando el pH a 6 con NaOH 1 N. Posteriormente, se tomaron 10 mL de la alícuota diluida y



se transfirieron a la columna (previamente preparada). Se lavó la columna con 15 mL de NaCl 0.1 N (para eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol). Se eluyó al fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N y se colectó el extracto purificado. Finalmente, se realizó la determinación espectrofotométrica, para lo cual se tomaron 3 mL de agua desionizada (utilizada como blanco), 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio conteniendo de 5 a 50 µg/mL en agua desionizada) y 3 mL de los extractos purificados a través de la columna, los cuales se ajustaron previamente a pH 3 y se les adicionó 1 mL de reactivo de Wade (0.03% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.3% ácido sulfosalicílico en agua desionizada). Se sometieron a agitación en un vortex por 5 s y se leyó la absorbancia a 500 nm. Se usó una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero y se leyó la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares; a cada una de estos valores se le restó por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva. Se realizó la curva patrón con fitato de sodio y por regresión lineal se interpolaron los datos para obtener la concentración de ácido fítico presente en las muestras.

## **5.7 Análisis nutracéutico de los germinados**

### **5.7.1 Perfil fitoquímico mediante HPLC**

El perfil fitoquímico se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent 1200) con un detector de arreglo de diodos (DAD) acoplado a un detector de espectrometría de masas (MSD) equipado con una interfase de electrospray (ESI) (Agilent 1100), utilizando una columna Zorbax ODS-18 (15 x 4.6 mm, 5 µm) a 40 °C. El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización negativa utilizando las siguientes condiciones: voltaje de capilar de 4000 V, presión de nebulizador de 40 psi, flujo de gas nebulizador de 10 L/min, temperatura del gas de nebulizador de 300 °C, voltaje del cuadrupolo de 150 V, voltaje del fragmentador de 130 V. Los espectros de masas se adquirieron en un rango de 80-1200 m/z.

La separación de polifenoles se realizó utilizando como fase móvil agua:ácido fórmico 99:1 (A) y acetonitrilo (B) en condiciones de gradiente: 95/5 (A/B) de 0-20 min, 80/20 de 20-25 min, 60/40 de 25-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min y se realizó la medición de absorbancias a 280, 320 y 360 nm. La cuantificación de ácidos fenólicos se realizó utilizando ácido gálico como estándar, catequina para flavonoides y genisteína para isoflavonas.

Para la separación de fitoesteroles se utilizó como fase móvil metanol (A) y agua: acetonitrilo 99:1 (B) en condiciones de gradiente: 85/15 A/B de 0-15 min, 100/0 de 15-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min y se realizó la medición de absorbancias a 205 nm. Para la cuantificación de fitoesteroles se utilizó  $\beta$ -sitosterol como estándar.

En la separación de saponinas se utilizó como fase móvil acetonitrilo:ácido fórmico 99.9:0.1 (A) y agua:ácido fórmico 99.9:0.1 (B) en condiciones de gradiente: 75/25 A/B de 0-3 min, 50/50 de 3-20 min, 20/80 de 20-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. El flujo de la fase móvil fue de 0.4 mL/min y se realizó la medición de absorbancias a 310 nm. Para la cuantificación de saponinas se utilizó soyasaponina I como estándar.

## **5.8 Análisis en células Hepa1c1c7**

### **5.8.1 Cultivo celular**

Se empleó la línea celular de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7; American Type Culture Collection-ATCC, Rockville, MD, EUA), en la cual se han ensayado la inducción de sistemas antioxidantes. El mantenimiento y las transferencias se realizaron en base a los protocolos de la ATCC. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70%, se transfirieron con ayuda de 0.25% de tripsina-EDTA (1x) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA) y se sembraron en nuevas placas.

### 5.8.2 Tratamientos

Las células Hepa1c1c7 se sembraron a una densidad de  $7 \times 10^5$  en placas de 12 pozos hasta una confluencia de 70–80%; se removió el medio de cultivo y se enjuagaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, se adicionó 1 mL de extracto de los germinados disueltos en DMSO al 0.5% (anexo 1), además de un control con glucosa basal (5.5 mM). Éstos se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Al finalizar los tratamientos (cuadro 1), las células se enjuagaron dos veces con PBS estéril para eliminar rastros de los extractos.

**Cuadro 1. Extractos de diferentes germinados de garbanzo empleados a diferentes concentraciones en células Hepa1c1c7**

Tratamiento	Concentración
Extracto germinado control	10 µg/mL
Extracto germinado control	100 µg/mL
Extracto germinado inducido con AS 2 mM	10 µg/mL
Extracto germinado inducido con AS 2 Mm	100 µg/mL

### 5.8.3 Viabilidad celular (prueba MTT):

Esta prueba se realizó con el ensayo MTT (bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio, de la marca Sigma (St. Louis, MO, EUA) basado en la reducción metabólica del reactivo realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que genera el compuesto formazán. El ensayo permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células, donde el número de células vivas es proporcional a la cantidad del compuesto azul oscuro (formazán) producido. La técnica se realizó siguiendo los protocolos del laboratorio de alimentos funcionales

a cargo de la Dra. Nuria Rocha (Unidad de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango) con algunas modificaciones. Una vez concluido el tratamiento, se adicionaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo DMEM sin glucosa más 100  $\mu$ L de solución preparada de MTT a cada pozo. La placa se incubó durante 30 min a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró cuidadosamente el medio y se añadieron 200  $\mu$ L de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm. Finalmente, se calculó la viabilidad celular en función de los valores de la absorbancia, cuyos valores se expresan en porcentajes.

#### **5.8.4 Ensayos de actividad antioxidante**

Para la obtención de los homogenados citosólicos celulares se utilizó la técnica de congelación (-70 °C) y descongelación del laboratorio del Dr. Kensler (Johns Hopkins University) con algunas modificaciones (anexo 2). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

##### **5.8.4.1 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)**

La concentración de GSH se determinó en base a la habilidad del grupo SH para reducir ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) (Ellman, 1959). Los niveles se expresaron en  $\mu$ M de GSH/mg de proteína contenida en las muestras.

Para la determinación de GSH se tomaron 50  $\mu$ L de homogenado citosólico, preparado como se mencionó anteriormente (anexo 2). Se adicionaron 40  $\mu$ L de agua destilada y 10  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) preparado al 20%. Se incubaron las muestras en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 8500 g por 5 min. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y se colocaron 50  $\mu$ L del mismo en una placa de 96 pozos. Además, se adicionaron los siguientes reactivos:

- 150  $\mu$ L de solución amortiguadora TRIS-EDTA (anexo 2)
- 80  $\mu$ L de metanol puro
- 20  $\mu$ L de DTNB (anexo 3)

Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 min y finalmente se leyó la absorbancia 412 nm.

#### 5.8.4.2 Evaluación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST)

La evaluación de la actividad de la GST se basa en la reacción catalizada por la GST que reduce el GSH en presencia de cloro-dinitro-benceno (CDNB) a glutatión reducido-dinitrobenzono (GS-dinitrobenzono). La absorbancia de dicho producto es cuantificable a 340 nm (Habig *et al.*, 1974).

Para la técnica se siguieron protocolos del laboratorio del Dr. Kensler (Johns Hopkins University). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de homogenado citosólico, preparado como se mencionó anteriormente (anexo 2), se colocaron en una placa de 96 pozos y se adicionaron los siguientes reactivos:

- 100  $\mu\text{L}$  de solución de GSH 3 mM (anexo 5)
- 150  $\mu\text{L}$  de solución de CDNB 2 mM (anexo 6)

Se midió la absorbancia a 340 nm durante 2 min en intervalos de 20 s.

La actividad de la GST se calculó en nmol/mg de proteína/min con la siguiente ecuación:

$$GST = \frac{\Delta A/min}{(Coef. ext. CDNB)(mg proteína)}$$

Donde:

$\Delta A/min$  = valor de: absorbancia del minuto 2 – absorbancia del minuto 1 de la muestra

Coefficiente de extinción del CDNB =  $0.0096 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

### 5.8.4.3 Evaluación de la actividad de quinona reductasa (NQO1)

La evaluación de la actividad de NQO1 se basa en la reacción catalizada por la NQO1 que reduce la menadiona a menadiol mediante la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH); posteriormente, el menadiol reduce el compuesto MTT resultando la formación de una coloración azul cuantificable a una longitud de onda de 610 nm (Prochaska & Santamaria, 1988).

Para la técnica se siguieron protocolos del laboratorio del Dr. Kensler (Johns Hopkins University). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de homogenado citosólico, preparado como se mencionó anteriormente (anexo 2), se colocaron en una placa de 96 pozos y se adicionaron los siguientes reactivos en el orden mencionado:

- 200  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora suplementada con menadiona (anexo 7)

Se incubó la placa durante 5 min a temperatura ambiente

- 50  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora suplementada con dicumarol (anexo 8)

Se midió la absorbancia a 610 nm.

La actividad de NQO1 se calculó en nmol/mg de proteína/por minuto empleando la siguiente ecuación:

$$QR = \frac{A_{610}}{(\epsilon)(mg\ prote\acute{a}na)(min)(F)}$$

Donde:

$A_{610}$  = absorbancia de la muestra

$\epsilon$  = MTT  $\epsilon_{610} = 11.3\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Min = minutos de reacción = 5

F = factor de corrección = 3.333

#### **5.8.4.4 Cuantificación de proteína por BCA**

La proteína total de las muestras se llevó a cabo utilizando el kit enzimático Pierce BCA Protein Assay Kit (Termo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

Para lo anterior, se obtuvieron los homogenados citosólicos (anexo 2); se colocaron 50  $\mu$ L de muestra en una placa de 96 pozos y se añadieron los reactivos de la siguiente forma:

- 250  $\mu$ L de solución de trabajo (1:50)  $\rightarrow$  1- reactivo A; 50- reactivo B

Se incubó la placa a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se colocó en el lector de microplacas y se programó agitación durante 30 s. Finalmente se leyó la absorbancia a 562 nm.

#### **5.9 Análisis estadístico**

Los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, seguida de la comparación de medias por la prueba de Dunnet para evaluar parámetros agronómicos, mientras que, la prueba de Tukey se utilizó para evaluar el contenido de compuestos bioactivos y la actividad biológica de los mismos. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico JMP 8.0. (SAS Institute, EUA) y los gráficos se realizaron con ayuda del paquete GraphPad 5.0 (GraphPad Software, Incorporated, EUA).

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Parámetros agronómicos de los germinados de garbanzo inducidos químicamente**

En la Figura 1 se muestran los porcentajes de germinación de las semillas de garbanzo de los cultivares Blanoro, Patrón y San Antonio. Los tres cultivares presentaron porcentajes de germinación superiores al 90%; sin embargo, en relación a la aplicación de tratamientos con diferentes inductores químicos el cultivar Blanoro solamente presentó diferencia estadística al tener un porcentaje de germinación superior en los tratamientos con QN 7  $\mu$ M y AS 2 mM, respecto a su control sin inducción química. En los otros dos cultivares Patrón y San Antonio elicitados no se observaron porcentajes de germinación mayores o menores de los tratamientos respecto al germinado control.

Por otro lado, la longitud de la radícula que presentaron las semillas germinadas de los cultivares mencionados anteriormente se muestran en la Figura 2. Se observaron diferencias significativas en el cultivar Patrón con el tratamiento de QN 7  $\mu$ M y en el cultivar San Antonio con el tratamiento AS 1 mM, los cuales fueron superior e inferior, respectivamente, tomando como referencia la longitud de la radícula del germinado control. El cultivar Blanoro elicitado no presentó una longitud radicular superior o inferior respecto al control.



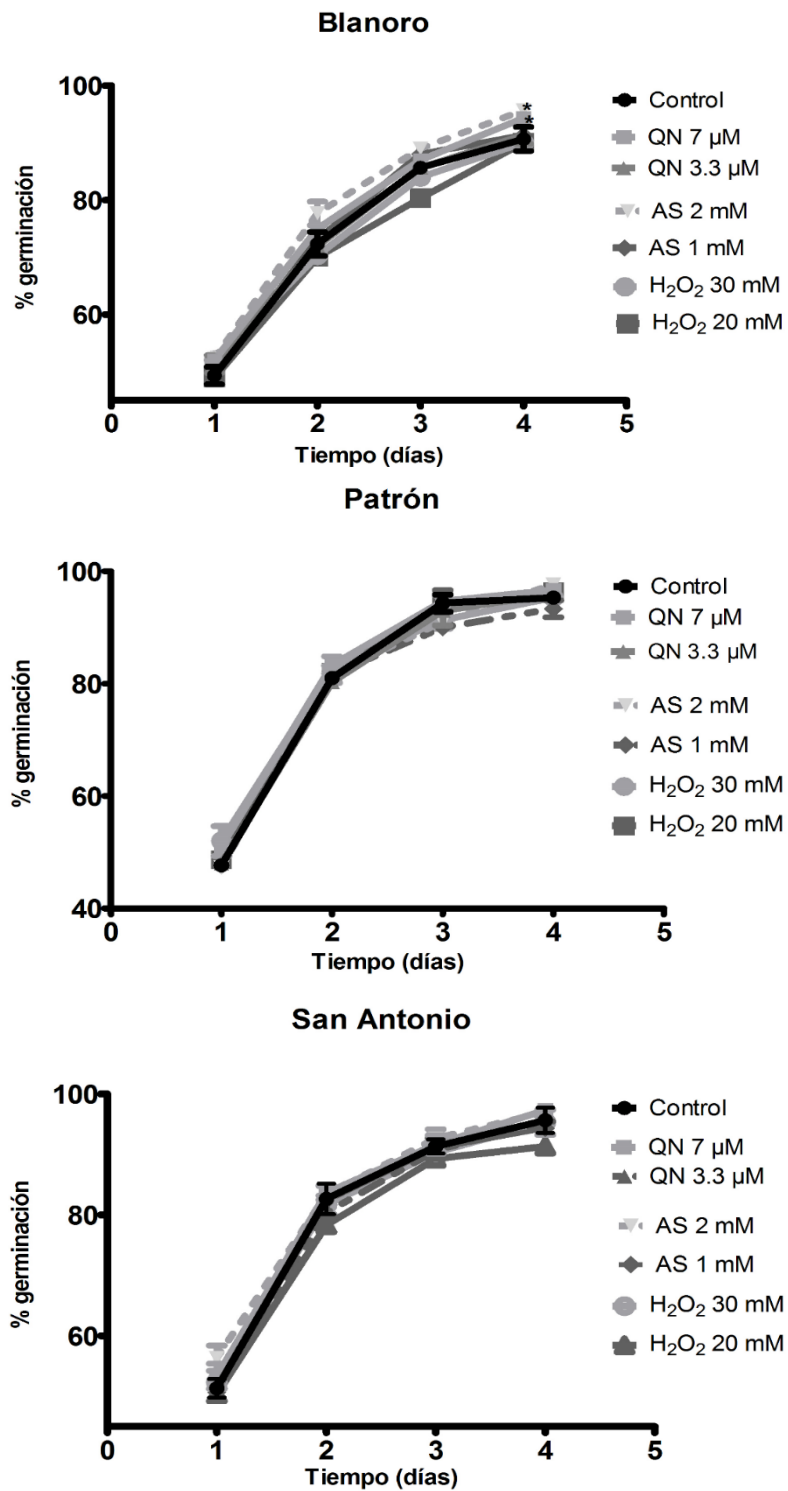
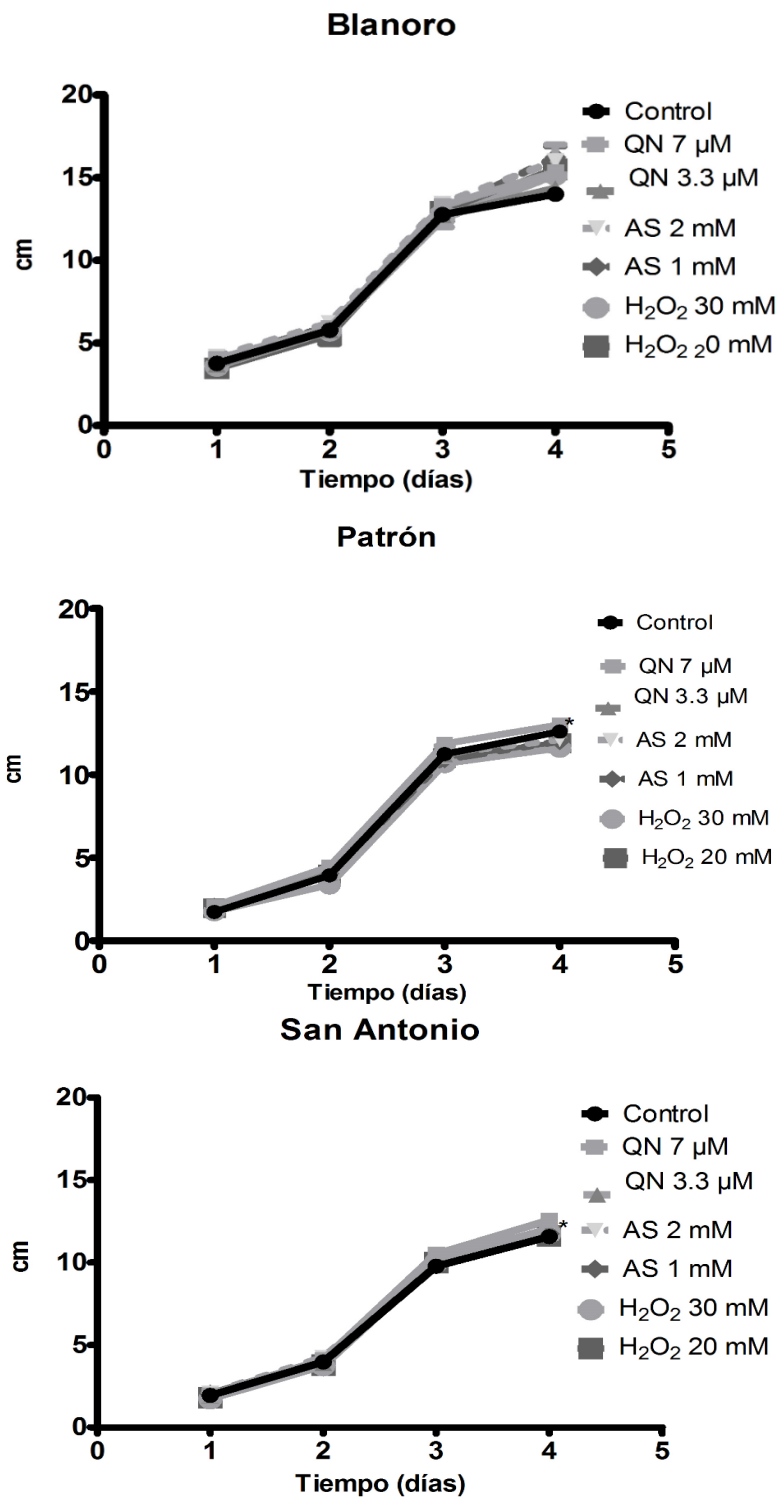


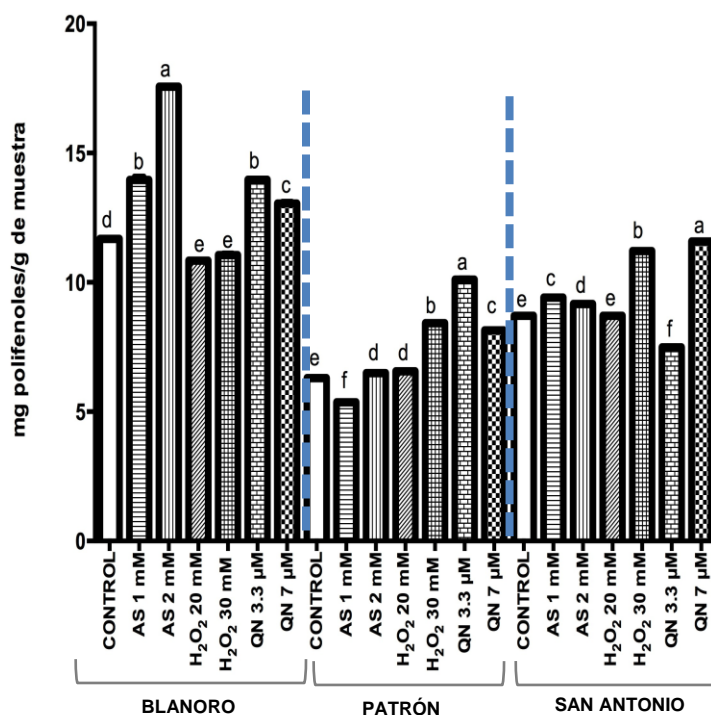
Figura 1. Porcentaje de germinación en semillas de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ). Control: germinado con agua destilada. AS: ácido salicílico; QN: quitosano.



**Figura 2. Tamaño de radícula en semillas germinadas de diferentes variedades de garbanzo inducidas químicamente.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Dunnet ( $\alpha = 0.05$ ). Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

## 6.2. Contenidos totales de fitoquímicos en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente

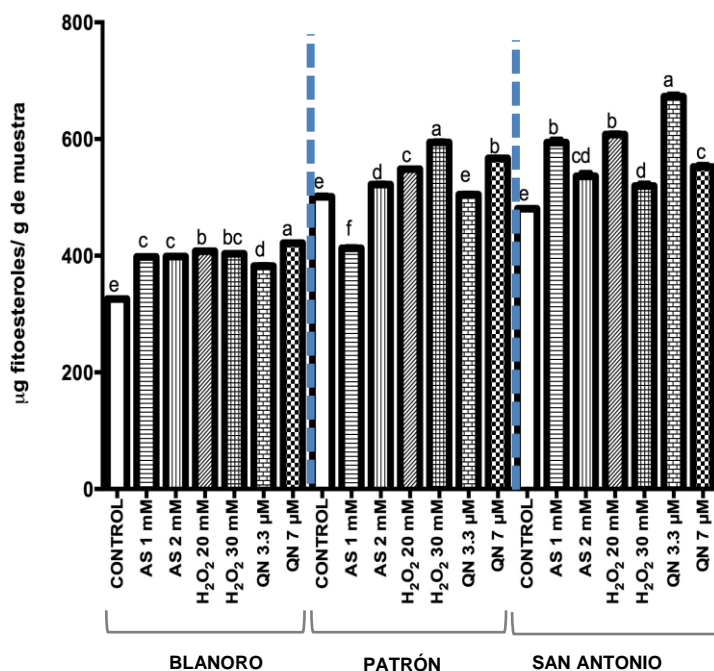
La Figura 3 muestra el contenido de polifenoles en los germinados de garbanzo por cada cultivar, así como por tratamiento de inducción química. Se puede observar que en los tres cultivares se encontraron tratamientos estadísticamente diferentes respecto al control, por lo que la inducción química tuvo efectos positivos al incrementar en mayor proporción el contenido de polifenoles en el cultivar Blanoro tratado con AS 2 mM; el cultivar Patrón fue superior en el tratamiento con QN 3.3  $\mu$ M; mientras que, el cultivar San Antonio también superó a los demás tratamientos en la inducción con QN 7  $\mu$ M.



**Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

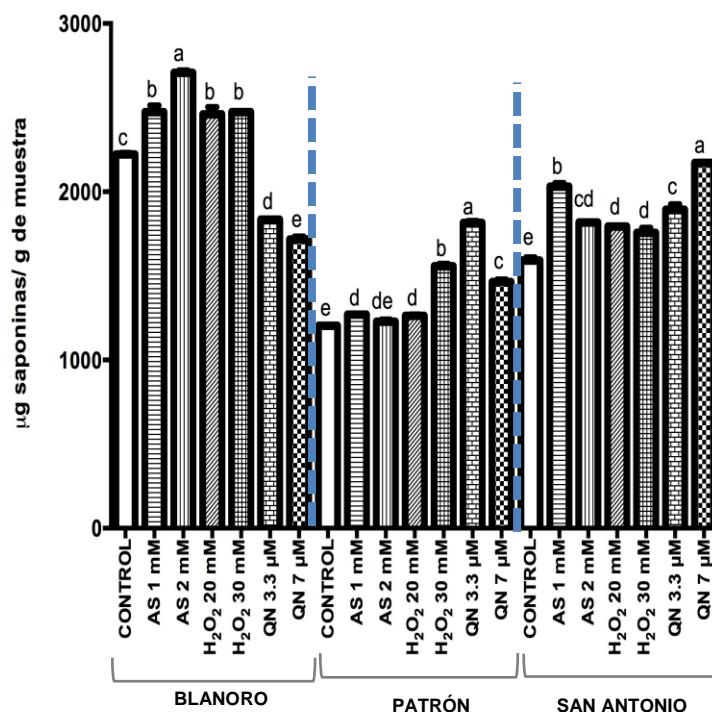
La Figura 4 muestra el contenido de fitoesteroles en los germinados de garbanzo por cada cultivar, así como por tratamiento de inducción química. Se puede observar que en los tres cultivares se encontraron tratamientos estadísticamente diferentes respecto al control; sin embargo, en el caso del cultivar Blanoro se encontró que la mayoría de los tratamientos fueron similares entre sí. En el caso de los cultivares Patrón y San Antonio se observan diferencias más marcadas, siendo los tratamientos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM y QN 3.3 μM, respectivamente, los que presentaron el mayor contenido de fitoesteroles.



**Figura 4. Contenido de fitoesteroles totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

La Figura 5 muestra el contenido de saponinas en los germinados de garbanzo por cada cultivar, así como por tratamiento de inducción química. Se puede observar que en los tres cultivares se encontraron tratamientos estadísticamente diferentes respecto al control, por lo que la inducción química tuvo efectos positivos al incrementar en mayor proporción el contenido de saponinas en el cultivar Blanoro tratado con AS 2 mM; el cultivar Patrón fue superior en el tratamiento con QN 3.3  $\mu$ M; mientras que, el cultivar San Antonio también superó a los demás tratamientos en la inducción con QN 7  $\mu$ M.



**Figura 5. Contenido de saponinas totales mediante HPLC en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

Qiaoying y colaboradores en 2009 observaron que durante la germinación del garbanzo se incrementa el contenido de compuestos fenólicos como son las isoflavonas. De manera similar, la inducción química con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la germinación de otras leguminosas como el frijol común, incrementa el contenido de compuestos fenólicos y saponinas en una proporción del doble respecto al control sin inducir (Mendoza-Sánchez *et al.*, 2016).

### **6.3. Identificación y cuantificación de compuestos fitoquímicos en germinados de diferentes cultivares de garbanzo inducidos químicamente**

De acuerdo a la literatura, el análisis detallado del perfil fitoquímico presente en un material en particular es indispensable para inferir sobre sus propiedades biológicas. Por lo anterior, en el presente proyecto se analizó el perfil fitoquímico de los germinados de tres cultivares de garbanzo a través de un sistema HPLC-MS, confirmándose que las isoflavonas biocanina A, formonotetina y genisteína (Gupta *et al.*, 2017), fueron los compuestos mayoritarios presentes en los germinados de los tres cultivares: Blanoro (Cuadro 2), Patrón (Cuadro 3) y San Antonio (Cuadro 4).

El germinado control del cultivar Blanoro presentó los niveles más altos (mg/g) de formonotetina y biocanina A ( $3.33 \pm 0.03$  y  $4.46 \pm 0.03$ ), seguido del germinado del cultivar San Antonio ( $2.53 \pm 0.00$  y  $1.96 \pm 0.01$ ) y del germinado del cultivar Patrón ( $1.52 \pm 0.00$  y  $1.37 \pm 0.01$ ), respectivamente. En cuanto a la genisteína, la mayor concentración (mg/g) se detectó en el germinado control del cultivar San Antonio ( $1.84 \pm 0.01$ ), seguido de los germinados de los cultivares Blanoro ( $1.60 \pm 0.01$ ) y Patrón ( $1.43 \pm 0.01$ ).

De manera adicional se detectaron y cuantificaron compuestos fenólicos previamente reportados en la semilla y el germinado de garbanzo e incluyeron: ácido clorogénico, epicatequina, daidzeína, quercetina y rutina, y en menor

concentración catequina, secoisolariciresinol y los ácidos protocatecuico, gálico, 4-hidroxibenzoico, cumárico y sináptico (Wu *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que en el presente estudio también se identificaron y cuantificaron (> 0.10 mg/g) en los germinados de garbanzo compuestos no previamente reportados o detectados en la literatura, e incluyeron: Matairesinol y galato de epigallocatequina, además de otros compuestos en concentraciones menores a 0.10 mg/g de muestra (metil galato, kaempferol, galato de epicatequina).

La aplicación de elicitores durante la germinación incrementó los contenidos de las tres isoflavonas mayoritarias presentes en los germinados de garbanzo (genisteína, biocanina A y formonotetina), detectándose los mayores incrementos con el tratamiento AS 2 mM para el cultivar Blanoro (14, 43 y 80%, respectivamente; Cuadro 2), los tratamientos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM y QN 3.3 μM para el cultivar Patrón (17, 78 y 114%, respectivamente; Cuadro 3) y el tratamiento QN 7 μM para el cultivar San Antonio (35, 22 y 45%, respectivamente; Cuadro 4). Estos resultados sugieren que los cultivares evaluados difieren en su respuesta a la inducción química, en cuanto al elicitor y su concentración.

De manera adicional, en el cultivar Blanoro tratado con AS 2 mM se detectaron incrementos importantes del 27 al 189% en los contenidos de epicatequina, matairesinol, metil galato, kaempferol, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, ácido cumárico y quercetina, obteniéndose el mayor incremento para este último flavonoide mencionado.

En lo que respecta a los germinados del cultivar Patrón tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM y QN 3.3 μM se detectaron los incrementos más importantes (del 30 al 333%) en los contenidos de ácido clorogénico, epicatequina, daidzeína, matairesinol, metil galato, kaempferol, galato de epigallocatequina, rutina y quercetina, obteniéndose nuevamente el mayor incremento para este último flavonoide.

En el cultivar San Antonio tratado con QN 7  $\mu$ M se detectaron incrementos del 21 al 129% en los contenidos de ácido clorogénico, daidzeína, matairesinol, kaempferol, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, ácido cumárico y quercetina, obteniéndose el mayor incremento para este último flavonoide en los germinados inducidos químicamente.

Los beneficios a la salud asociados a la semilla de garbanzo se atribuyen a las dos principales isoflavonas, biocanina A y formonotetina, las cuales poseen actividades hipolipidémica y anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante (Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016). De acuerdo a estudios *in vivo* e *in vitro*, la actividad antioxidante de estas dos isoflavonas está mediada por el factor Nrf2 (Liu *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2017).

De manera adicional, en la semilla y los germinados de garbanzo se encuentran presentes los potentes fitoestrógenos daidzeína, genisteína y secoisolariciresinol, los cuales pueden ser biotransformados de manera extensiva en humanos para producir metabolitos como el equol y la enterolactona (Peterson *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). El compuesto equol se produce principalmente a través de la actividad de la microbiota intestinal sobre los precursores daidzeína y genisteína, tiene un tiempo de vida más prolongado que la daidzeína, y mayor actividad biológica, incluyendo una mayor actividad antioxidante (Jackman *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). De manera similar, la enterolactona se forma a partir de los precursores secoisolariciresinol y matairesinol y el alto consumo de estos compuestos se ha asociado con una protección contra enfermedades cardiovasculares (Peterson *et al.*, 2010) o atenuación del estrés oxidativo en modelo inducido de síndrome metabólico (Pilar *et al.*, 2017).

Como se mencionó previamente, en los tres cultivares de garbanzo se obtuvo el mayor incremento en el contenido de quercetina con la inducción química de los germinados. El compuesto quercetina posee actividad antioxidante a través de la inducción de las enzimas GST y GPx mediada por el factor Nrf2, y anticancerígena a través de la inhibición de la cinasa B Aurora (AURKB), inhibidor del gene



supresor de tumores p53, y la inducción de apoptosis a través de EROs (Saw *et al.*, 2014; Chikara *et al.*, 2018). Así mismo, se obtuvieron incrementos importantes para los flavonoides kaempferol, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina, los cuales también inducen los sistemas de defensa antioxidante a través del factor Nrf2 y ejercen actividad anticancerígena a través de diversos mecanismos (Na & Surh, 2008; Saw *et al.*, 2014; Chikara *et al.*, 2018), siendo el galato de epigallocatequina uno de los fitoquímicos más ampliamente estudiado.

En cuanto al contenido de saponinas, se detectaron y cuantificaron compuestos previamente reportados en la literatura e incluyeron: Soyasaponina Af, soyasaponina Ba (V), soyasaponina Bb (I), soyasaponina Bd, soyasaponina  $\alpha$ g, soyasaponina  $\beta$ g y soyaasaponina VI (Ruiz *et al.*, 1996; Serventi *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2014), siendo las soyasaponinas Af y VI los compuestos mayoritarios presentes en los germinados de los tres cultivares: Blanoro (Cuadro 5), Patrón (Cuadro 6) y San Antonio (Cuadro 7).

De manera similar, la aplicación de elicitores durante la germinación incrementó los contenidos de las saponinas mayoritarias presentes en los germinados de garbanzo (soyasaponinas Af y VI), detectándose los mayores incrementos con el tratamiento AS 2 mM para el cultivar Blanoro (38 y 25%, respectivamente; Cuadro 5), QN 3.3  $\mu$ M para el cultivar Patrón (53 y 25%, respectivamente; Cuadro 6) y QN 7  $\mu$ M para el cultivar San Antonio (59 y 35%, respectivamente; Cuadro 7). Estos resultados nuevamente indican que los cultivares evaluados difieren en su respuesta a la inducción química, en cuanto al elicitador y su concentración.

De acuerdo a la revisión de la literatura, en el presente estudio se identificó y cuantificó por primera vez el compuesto faseósido I en los germinados de garbanzo control y elicitados químicamente, encontrándose incrementos importantes del 62% en el cultivar Blanoro tratado con AS 2 mM (Cuadro 5), hasta de 655% para el cultivar Patrón tratado con QN 3.3  $\mu$ M (Cuadro 6) y del 160% en el cultivar San Antonio tratado con QN 7  $\mu$ M (Cuadro 7). Para el resto de las

saponinas identificadas en el presente estudio no se encontraron incrementos importantes en los germinados elicitados con las condiciones arriba mencionadas.

Los beneficios a la salud asociados a las saponinas incluyen una actividad hipocolesterolemica a través del control de los niveles de colesterol en plasma como resultado de una disminución en la tasa de absorción (Sidhu & Oakenfull, 1986). Así mismo, se ha evaluado su efecto protector en un modelo inducido de diabetes mediante la atenuación del daño renal a través de la inducción de sistemas antioxidantes, entre otros mecanismos, en ratas diabéticas a las cuales se les administró un extracto total de saponinas de garbanzo (Kaiser et al., 2012). De manera similar, extractos totales de saponinas provenientes de otras fuentes naturales confirman que la actividad antioxidante de las saponinas está mediada por el factor Nrf2 tanto *in vivo* como *in vitro* (Fan et al., 2016; Kang et al., 2016; Choi et al., 2017).

Finalmente, se detectaron y cuantificaron fitoesteroles previamente reportados en la literatura e incluyeron el  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Jukanti et al., 2012), siendo el  $\beta$ -sitosterol el componente mayoritario en los germinados control de los tres cultivares de garbanzo: Blanoro (Cuadro 8), Patrón (Cuadro 9) y San Antonio (Cuadro 10). Así mismo, se identificaron y cuantificaron los compuestos  $\Delta$ 5-avenasterol y  $\Delta$ 7-avenasterol en el germinado control del cultivar Blanoro; los compuestos campesterol, sitosteril-3- $\beta$ -glucopiranosido y campesteril-3- $\beta$ -glucopiranosido en el germinado control del cultivar Patrón; mientras que, en el germinado del cultivar San Antonio se identificaron también los compuestos campesteril-3- $\beta$ -glucopiranosido, fucosterol,  $\Delta$ 7-avenasterol y sitosteril-3- $\beta$ -glucopiranosido.

A diferencia de los resultados derivados de la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y saponinas, los germinados de los tres cultivares evaluados no presentaron diferencias en su respuesta a la inducción química, es decir, los contenidos de los fitoesteroles se mantuvieron aumentados o disminuidos independientemente del elicitador y la concentración aplicada. A pesar de esta

observación, se detectaron incrementos importantes en el contenido de  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\Delta$ 5-avenasterol, brasicasterol y ergosterol del 21-364% en el cultivar Blanoro con AS 2 mM, obteniéndose el mayor incremento para el compuesto ergosterol (Cuadro 8). En los germinados del cultivar Patrón elicitados químicamente, el incremento más importante del componente mayoritario  $\beta$ -sitosterol se detectó en el tratamiento de QN 7  $\mu$ M (50%); bajo esta misma condición, el compuesto fucoesterol se incrementó en un 1,137% con respecto al valor en el germinado control de este cultivar. También se detectaron incrementos importantes en otros fitoesteroles en los germinados elicitados con AS 2 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM (Cuadro 9). En lo que respecta a los germinados del cultivar Patrón elicitados químicamente, el incremento más importante del componente mayoritario  $\beta$ -sitosterol se detectó también en el tratamiento de QN 7  $\mu$ M (71%); detectándose incrementos importantes en otros fitoesteroles en los germinados elicitados con AS 1 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM (Cuadro 9).

Evidencia epidemiológica indica una menor tasa de cáncer de colon en poblaciones con consumo elevado de ciertas leguminosas, incluyendo el garbanzo (Gupta *et al.*, 2017). En este contexto, diversos estudios en modelos animales de cáncer de colon inducidos químicamente confirman el efecto quimioprotector del tratamiento con  $\beta$ -sitosterol (0.2 p/v) por 8 semanas sobre el desarrollo de tumores malignos (Deschner *et al.*, 1982), de la harina de garbanzo administrada al 10% (p/p) por 10 semanas sobre el número y multiplicidad de fosas cólicas aberrantes (Murillo *et al.*, 2004), así como del consumo de garbanzo cocido al 2 y 10% (p/p) por 10 semanas sobre marcadores inflamatorios y proliferativos (Chino-Sánchez *et al.*, 2017), entre otros estudios. Así mismo, se ha evidenciado la actividad antioxidante del  $\beta$ -sitosterol en un modelo de nefrotoxicidad inducida en ratas Wistar a través de la inducción de genes regulados por el factor Nrf2 (Sharmila *et al.*, 2016).

**Cuadro 2. Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente**

Compuesto fenólico (mg/g de muestra)	Tiempo de retención	Blanoro - Control			Blanoro-AS 1 mM			Banoro-AS 2 mM			Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM			Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM			Blanoro-QN 3.3 μM			Blanoro-QN 7 μM		
Ác. clorogénico	1.9	0.26	±	0.01	0.26	±	0.00	0.32	±	0.02	0.20	±	0.00	0.23	±	0.00	0.25	±	0.00	0.23	±	0.00
Epicatequina	2.0	0.32	±	0.01	0.30	±	0.00	0.43	±	0.00	0.24	±	0.01	0.28	±	0.00	0.30	±	0.00	0.27	±	0.00
Catequina	3.0	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.06	±	0.00	0.05	±	0.00	0.06	±	0.00	0.05	±	0.00	0.06	±	0.00
Ác. gálico	3.7	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.03	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00
Ác. 4-hidroxibenzoico	4.2	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00
Genisteina	5.2	1.60	±	0.01	1.47	±	0.01	1.83	±	0.01	1.28	±	0.01	1.28	±	0.00	1.56	±	0.01	1.33	±	0.00
Daidzeina	5.6	0.29	±	0.01	0.31	±	0.00	0.34	±	0.00	0.23	±	0.00	0.24	±	0.00	0.28	±	0.00	0.25	±	0.00
Matairesinol	6.2	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00	0.37	±	0.00	0.20	±	0.00	0.23	±	0.00	0.27	±	0.00	0.26	±	0.00
Metil galato	7.1	0.07	±	0.00	0.08	±	0.00	0.11	±	0.00	0.06	±	0.00	0.05	±	0.00	0.06	±	0.00	0.08	±	0.00
Secoisolariciresinol	9.6	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.32	±	0.00	0.10	±	0.00
Etil galato	12.1	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.04	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00
Kaempferol	14.1	0.05	±	0.00	0.06	±	0.00	0.10	±	0.00	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00
Ác. protocatecuico	14.5	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00
Galato de epicatequina	14.7	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.08	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00
Galato de epigallocatequina	16.0	0.20	±	0.00	0.28	±	0.00	0.33	±	0.00	0.19	±	0.00	0.19	±	0.00	0.37	±	0.00	0.25	±	0.00
Ác. <i>p</i> -cumárico	16.2	0.09	±	0.00	0.11	±	0.00	0.15	±	0.00	0.08	±	0.00	0.08	±	0.00	0.10	±	0.00	0.09	±	0.00
Ác. rosmarínico	16.7	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
Quercetina	17.2	0.19	±	0.00	0.27	±	0.01	0.55	±	0.00	0.18	±	0.00	0.20	±	0.00	0.24	±	0.00	0.24	±	0.00
Formononetina	17.4	3.37	±	0.03	4.59	±	0.06	6.08	±	0.06	3.22	±	0.01	3.24	±	0.01	4.05	±	0.01	4.10	±	0.02
Biocanina A	18.9	4.46	±	0.03	5.44	±	0.07	6.37	±	0.05	4.37	±	0.01	4.45	±	0.04	5.66	±	0.01	5.33	±	0.09
Ác. sinápico	21.3	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
Eriocitrina	21.5	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00
Ác. elágico	22.5	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00

<b>Rutina</b>	27.0	0.21	±	0.00	0.21	±	0.00	0.22	±	0.00	0.27	±	0.00	0.28	±	0.00	0.28	±	0.00	0.28	±	0.00
Σ compuestos fenólicos		11.6	±	0.10	13.96	±	0.17	17.57	±	0.16	10.83	±	0.05	11.05	±	0.07	13.97	±	0.06	13.05	±	0.13

**Cuadro 3. Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente**

Compuesto fenólico (mg/g muestra)	Tiempo de retención	Patrón - Control			Patrón-AS 1 mM			Patrón-AS 2 mM			Patrón-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM			Patrón-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM			Patrón-QN 3.3 μM			Patrón-QN 7 μM		
Ác. clorogénico	1.9	0.32	±	0.00	0.27	±	0.00	0.38	±	0.01	0.35	±	0.00	0.40	±	0.00	0.42	±	0.00	0.38	±	0.00
Epicatequina	2.0	0.43	±	0.00	0.39	±	0.00	0.60	±	0.00	0.49	±	0.00	0.70	±	0.01	0.66	±	0.00	0.55	±	0.00
Catequina	3.0	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.05	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00
Ác. gálico	3.7	0.02	±	0.00	0.03	±	0.00	0.03	±	0.00	0.03	±	0.00	0.03	±	0.00	0.03	±	0.00	0.04	±	0.00
Ác. 4-hidroxibenzoico	4.2	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00
Genisteina	5.2	1.43	±	0.01	1.20	±	0.01	1.63	±	0.00	1.37	±	0.01	1.68	±	0.01	1.42	±	0.01	1.64	±	0.01
Daidzeina	5.6	0.23	±	0.00	0.21	±	0.00	0.31	±	0.00	0.24	±	0.00	0.30	±	0.00	0.28	±	0.00	0.30	±	0.00
Matairesinol	6.2	0.27	±	0.00	0.23	±	0.00	0.37	±	0.00	0.31	±	0.00	0.35	±	0.00	0.38	±	0.00	0.32	±	0.00
Metil galato	7.1	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00	0.04	±	0.00
Secoisolariciresinol	9.6	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.10	±	0.00	0.07	±	0.00	0.10	±	0.00	0.11	±	0.00	0.11	±	0.00
Etil galato	12.1	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.03	±	0.00	0.02	±	0.00	0.03	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00
Kaempferol	14.1	0.02	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.03	±	0.00
Ác. protocatecuico	14.5	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
Galato de epicatequina	14.7	0.04	±	0.00	0.03	±	0.00	0.04	±	0.00	0.03	±	0.00	0.05	±	0.00	0.03	±	0.00	0.04	±	0.00
Galato de epigallocatequina	16.0	0.12	±	0.03	0.11	±	0.00	0.17	±	0.00	0.18	±	0.00	0.20	±	0.00	0.33	±	0.00	0.19	±	0.00
Ác. <i>p</i> -cumárico	16.2	0.04	±	0.00	0.03	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.06	±	0.00	0.06	±	0.00	0.06	±	0.00
Ác. rosmarínico	16.7	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
Quercetina	17.2	0.06	±	0.00	0.05	±	0.00	0.07	±	0.00	0.06	±	0.00	0.09	±	0.00	0.26	±	0.00	0.10	±	0.00
Formononetina	17.4	1.52	±	0.00	1.26	±	0.01	1.31	±	0.01	1.52	±	0.01	2.13	±	0.01	3.26	±	0.01	2.06	±	0.01

<b>Biocanina A</b>	18.9	1.37	±	0.01	1.07	±	0.01	1.04	±	0.00	1.48	±	0.01	1.85	±	0.01	2.44	±	0.03	1.87	±	0.02
<b>Ác. sinápico</b>	21.3	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.04	±	0.00	0.02	±	0.00	0.03	±	0.00	0.05	±	0.00
<b>Eriocitrina</b>	21.5	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00
<b>Ác. elágico</b>	22.5	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
<b>Rutina</b>	27.0	0.20	±	0.00	0.26	±	0.00	0.27	±	0.00	0.21	±	0.00	0.27	±	0.00	0.21	±	0.00	0.27	±	0.00
<b>∑ compuestos fenólicos</b>		6.29	±	0.07	5.36	±	0.05	6.49	±	0.03	6.56	±	0.05	8.42	±	0.05	10.10	±	0.07	8.14	±	0.06

**Cuadro 4. Perfil fitoquímico de compuestos fenólicos mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente**

Compuesto fenólico (mg/g muestra)	Tiempo de retención	San Antonio - Control		San Antonio-AS 1 mM		San Antonio-AS 2 mM		San Antonio-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM		San Antonio-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM		San Antonio-QN 3.3 µM		San Antonio-QN 7 µM	
<b>Ác. clorogénico</b>	1.9	0.33	± 0.01	0.33	± 0.00	0.33	± 0.01	0.38	± 0.00	0.25	± 0.00	0.34	± 0.01	0.40	± 0.00
<b>Epicatequina</b>	2.0	0.40	± 0.00	0.40	± 0.00	0.37	± 0.00	0.40	± 0.00	0.18	± 0.00	0.41	± 0.00	0.45	± 0.02
<b>Catequina</b>	3.0	0.03	± 0.00	0.03	± 0.00	0.03	± 0.00	0.03	± 0.00	0.02	± 0.00	0.03	± 0.00	0.03	± 0.00
<b>Ác. gálico</b>	3.7	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00	0.01	± 0.00
<b>Ác. 4-hidroxibenzoico</b>	4.2	0.01	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00
<b>Genisteina</b>	5.2	1.84	± 0.01	2.03	± 0.01	1.86	± 0.00	2.42	± 0.01	2.42	± 0.01	2.02	± 0.01	2.49	± 0.02
<b>Daidzeina</b>	5.6	0.35	± 0.00	0.37	± 0.00	0.35	± 0.00	0.46	± 0.02	0.42	± 0.00	0.40	± 0.00	0.47	± 0.01
<b>Matairesinol</b>	6.2	0.27	± 0.00	0.27	± 0.00	0.27	± 0.00	0.32	± 0.00	0.38	± 0.00	0.25	± 0.00	0.39	± 0.00
<b>Metil galato</b>	7.1	0.05	± 0.00	0.04	± 0.00	0.03	± 0.00	0.03	± 0.00	0.05	± 0.00	0.04	± 0.00	0.04	± 0.00
<b>Secoisolariciresinol</b>	9.6	0.11	± 0.00	0.19	± 0.00	0.14	± 0.00	0.13	± 0.00	0.13	± 0.00	0.13	± 0.00	0.11	± 0.00
<b>Etil galato</b>	12.1	0.02	± 0.00	0.04	± 0.00	0.03	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.04	± 0.00
<b>Kaempferol</b>	14.1	0.05	± 0.00	0.05	± 0.00	0.06	± 0.00	0.04	± 0.00	0.05	± 0.00	0.05	± 0.00	0.08	± 0.00
<b>Ác. protocatecuico</b>	14.5	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00	0.02	± 0.00
<b>Galato de epicatequina</b>	14.7	0.06	± 0.00	0.06	± 0.00	0.09	± 0.00	0.04	± 0.00	0.05	± 0.00	0.06	± 0.00	0.09	± 0.00
<b>Galato de epigallocatequina</b>	16.0	0.15	± 0.00	0.15	± 0.00	0.16	± 0.00	0.12	± 0.00	0.25	± 0.00	0.13	± 0.00	0.19	± 0.00

<b>Ác. <i>p</i>-cumárico</b>	16.2	0.06	±	0.00	0.06	±	0.00	0.06	±	0.00	0.03	±	0.03	0.07	±	0.00	0.05	±	0.00	0.07	±	0.00
<b>Ác. rosmarínico</b>	16.7	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
<b>Quercetina</b>	17.2	0.14	±	0.00	0.12	±	0.00	0.26	±	0.00	0.10	±	0.00	0.17	±	0.00	0.07	±	0.00	0.32	±	0.00
<b>Formononetina</b>	17.4	2.53	±	0.00	2.57	±	0.01	3.00	±	0.00	2.07	±	0.00	3.39	±	0.01	1.84	±	0.02	3.66	±	0.02
<b>Biocanina A</b>	18.9	1.96	±	0.01	2.35	±	0.01	1.77	±	0.01	1.75	±	0.02	2.96	±	0.01	1.31	±	0.02	2.39	±	0.02
<b>Ác. sinápico</b>	21.3	0.03	±	0.00	0.02	±	0.00	0.02	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00	0.01	±	0.00	0.02	±	0.00
<b>Eriocitrina</b>	21.5	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
<b>Ác. elágico</b>	22.5	0.00	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00
<b>Rutina</b>	27.0	0.28	±	0.00	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00	0.29	±	0.00
<b>Σ compuestos fenólicos</b>		8.71	±	0.04	9.41	±	0.06	9.16	±	0.05	8.71	±	0.10	11.21	±	0.04	7.48	±	0.08	11.58	±	0.10

Datos expresados como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

**Cuadro 5. Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente**

Saponinas (µg/g muestra)	Tiempo de retención	Blanoro Control	Blanoro-AS 1mM		Blanoro-AS 2 mM		Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM		Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM		Blanoro 3.3 µM		Blanoro-QN 7 µM		
Faseosido I	9.8	134.42 ± 3.12	177.14 ± 0.95	217.70 ± 2.33	158.87 ± 2.30	120.67 ± 1.99	131.73 ± 1.91	124.93 ± 3.20							
Soyasaponina Bb (I)	11.7	142.71 ± 0.70	124.51 ± 2.38	115.78 ± 0.78	113.04 ± 0.78	124.14 ± 1.21	107.57 ± 3.51	93.06 ± 1.78							
Soyasaponina Ba (V)	13.1	253.45 ± 1.65	285.74 ± 13.27	241.45 ± 5.37	263.83 ± 3.68	272.78 ± 7.80	233.52 ± 2.92	237.45 ± 2.43							
Soyasaponina Af	13.7	686.75 ± 7.89	816.64 ± 11.57	948.68 ± 7.12	766.53 ± 11.45	944.52 ± 11.68	507.23 ± 2.84	473.94 ± 4.21							
Soyasaponina Bd	14.9	61.70 ± 0.21	74.08 ± 0.98	49.52 ± 1.03	63.47 ± 0.41	48.76 ± 1.47	75.84 ± 0.26	56.06 ± 0.93							
Soyasaponina VI	19.2	771.86 ± 4.91	835.41 ± 6.75	961.30 ± 7.25	913.43 ± 20.92	854.98 ± 18.14	621.34 ± 8.72	542.97 ± 4.85							
Soyasaponina βg	25.4	112.89 ± 0.67	79.17 ± 2.19	85.75 ± 1.39	81.68 ± 2.50	58.43 ± 1.04	36.06 ± 0.14	41.12 ± 0.87							
Soyasaponina αg	27.2	58.40 ± 0.18	80.90 ± 1.49	87.18 ± 1.12	99.28 ± 0.72	48.72 ± 1.14	121.05 ± 0.65	147.00 ± 4.02							
Σ saponinas		2222.19 ± 19.33	2473.59 ± 39.60	2707.34 ± 26.38	2460.13 ± 42.75	2472.98 ± 44.48	1834.34 ± 20.95	1716.53 ± 22.29							

**Cuadro 6. Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente**

Saponinas (µg/g muestra)	Tiempo de retención	Patrón control	Patrón-AS 1 mM		Patrón-AS 2 mM		Patrón-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM		Patrón-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM		Patrón- QN 3.3 µM		Patrón-QN 7 µM	
Faseosido I	9.8	22.37 ± 0.51	45.20 ± 0.97	52.95 ± 1.81	42.46 ± 0.96	131.97 ± 3.66	168.89 ± 3.93	45.30 ± 1.39						
Soyasaponina Bb (I)	11.7	59.92 ± 1.66	88.31 ± 2.96	62.29 ± 0.97	65.18 ± 1.36	64.90 ± 118	92.33 ± 1.98	56.81 ± 2.00						
Soyasaponina Ba (V)	13.1	178.81 ± 3.71	139.55 ± 6.36	147.19 ± 0.46	144.88 ± 2.96	172.60 ± 3,27	185.67 ± 3.00	148.02 ± 1.19						
Soyasaponina Af	13.7	269.79 ± 4.37	277.66 ± 3.27	298.36 ± 6.92	298.80 ± 2.96	354.00 ± 2,54	411.43 ± 5.00	347.52 ± 9.03						
Soyasaponina Bd	14.9	102.48 ± 1.18	117.30 ± 0.50	119.53 ± 1.63	120.36 ± 2.69	102.26 ± 1,16	260.03 ± 1.84	249.29 ± 4.92						
Soyasaponina VI	19.2	306.43 ± 6.02	326.42 ± 4.84	302.33 ± 6.63	255.05 ± 4.69	333.63 ± 5,36	384.49 ± 4.39	290.92 ± 5.64						
Soyasaponina βg	25.4	14.44 ± 0.02	13.95 ± 0.66	14.11 ± 0.49	17.09 ± 0.27	14.31 ± 0,18	16.03 ± 0.17	14.61 ± 0.26						
Soyasaponina αg	27.2	249.20 ± 2.53	261.45 ± 3.21	230.39 ± 3.33	318.39 ± 8.29	383.43 ± 6,23	295.63 ± 6.68	310.84 ± 4.19						
Σ saponinas		1203.44 ± 20.01	1269.84 ± 22.77	1227.14 ± 22.24	1262.21 ± 24.19	1557.10 ± 23,59	1814.50 ± 26.98	1463.32 ± 28.63						



**Cuadro 7. Perfil fitoquímico de saponinas mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente**

Saponinas (µg/g muestra)	Tiempo de retención	San Antonio - Control			San Antonio-AS 1 mM			San Antonio-AS 2 mM			San Antonio-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM			San Antonio-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM			San Antonio-QN 3.3 µM			San Antonio-QN 7 µM		
Faseosido I	9.8	65.78	±	3.95	93.03	±	3.58	109.19	±	2.54	122.39	±	3.23	114.12	±	2.71	147.15	±	1.46	170.99	±	1.01
Soyasaponina Bb (I)	11.7	89.10	±	3.65	109.13	±	2.36	153.79	±	5.69	109.54	±	3.35	89.58	±	3.61	79.98	±	0.63	67.06	±	1.18
Soyasaponina Ba (V)	13.1	231.78	±	5.94	250.51	±	3.33	205.03	±	4.02	215.71	±	5.33	225.54	±	4.30	237.32	±	0.81	234.94	±	2.68
Soyasaponina Af	13.7	473.44	±	7.25	719.01	±	5.82	613.75	±	9.27	530.90	±	2.19	571.67	±	9.85	678.25	±	11.8	752.27	±	8.29
Soyasaponina Bd	14.9	39.65	±	0.90	36.74	±	0.49	0.00	±	0.00	37.52	±	1.01	0.00	±	0.00	47.82	±	1.39	47.36	±	1.15
Soyasaponina VI	19.2	506.50	±	7.29	638.01	±	8.65	520.03	±	4.35	602.69	±	5.72	606.66	±	5.57	566.98	±	10.6	685.96	±	3.70
Soyasaponina βg	25.4	57.93	±	1.11	44.33	±	0.78	38.95	±	1.37	42.49	±	0.41	60.68	±	1.26	43.99	±	0.75	87.23	±	1.24
Soyasaponina αg	27.2	127.23	±	3.76	138.39	±	4.31	176.72	±	3.30	132.01	±	1.23	86.96	±	3.38	91.62	±	7.30	125.29	±	3.54
Σ saponinas		1591.4	±	33.8	2029.1	±	29.3	1817.4	±	30.5	1793.2	±	22.4	1755.2	±	30.6	1893.1	±	34.8	2171.0	±	22.78

Datos se expresan como la media ± DE de cada cultivar. La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

**Cuadro 8. Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Blanoro inducido químicamente**

Fitoesteroles (µg/g muestra)	Tiempo de retención	Blanoro - Control			Blanoro-AS 1 mM			Banoro-AS 2 mM			Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20 mM			Blanoro-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM			Blanoro-QN 3.3 µM			Blanoro-QN 7 µM		
Brasicasterol	2.1	16.38	±	0.45	37.46	±	0.39	25.37	±	0.14	36.67	±	0.69	36.05	±	0.84	36.87	±	0.75	36.61	±	0.79
Ergosterol	2.3	4.26	±	0.16	23.72	±	0.15	19.76	±	0.42	22.41	±	0.32	23.05	±	0.70	20.59	±	0.29	17.90	±	0.20
Fucosterol	2.7	2.65	±	0.06	2.55	±	0.03	6.62	±	0.15	12.10	±	0.10	2.21	±	0.07	1.65	±	0.07	1.61	±	0.07
Δ5-Avenasterol	3.8	40.10	±	0.93	48.38	±	0.27	61.80	±	0.46	49.88	±	1.73	35.83	±	0.24	19.38	±	0.55	19.57	±	0.29
Δ7-Estigmasterol	6.3	2.14	±	0.15	3.67	±	0.05	3.21	±	0.09	2.04	±	0.04	2.52	±	0.09	3.62	±	0.03	5.34	±	0.22
β-Sitoesterol	7.3	165.63	±	0.08	198.86	±	0.58	199.74	±	0.98	195.40	±	0.65	197.04	±	0.99	197.95	±	0.55	199.74	±	0.22
β-Campesterol	87	17.97	±	0.07	30.28	±	0.40	27.90	±	0.27	20.97	±	0.62	20.44	±	0.06	29.54	±	0.65	35.95	±	0.36
Δ7-Avenasterol	16.9	35.88	±	0.14	22.49	±	0.45	20.52	±	0.29	25.61	±	0.36	34.67	±	0.28	26.55	±	0.91	35.46	±	0.22
Estigmastanol	17.1	4.93	±	0.19	3.65	±	0.14	4.53	±	0.01	4.91	±	0.17	6.65	±	0.08	5.11	±	0.09	5.09	±	0.03
Sitosteril-3-β-glucopiranosido	19.7	15.14	±	0.20	9.42	±	0.21	8.50	±	0.12	11.49	±	0.26	10.65	±	0.19	6.95	±	0.17	8.73	±	0.08
Campesteril-3-β-glucopiranosido	20.1	20.62	±	0.62	17.42	±	0.17	17.44	±	0.17	25.43	±	0.31	30.68	±	0.64	32.93	±	0.32	50.43	±	1.77
Estigmasteril-3-β-glucopiranosido	25.6	LDL			LDL			3.35	±	0.07	0.79	±	0.02	3.37	±	0.05	1.04	±	0.05	4.71	±	0.19
∑ fitoesteroles		325.70	±	3.05	397.91	±	2.82	398.74	±	3.18	407.69	±	5.27	403.15	±	4.23	382.18	±	4.42	421.15	±	4.42

**Cuadro 9. Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar Patrón inducido químicamente**

Fitoesteroles (µg/g muestra)	Tiempo de retención	Patrón - Control			Patrón-AS 1 mM			Patrón-AS 2 mM			Patrón-H2O2 20 mM			Patrón-H2O2 30 mM			Patrón-QN 3.3 µM			Patrón-QN 7 µM		
			±			±			±			±			±			±			±	
<b>Brasicasterol</b>	2.1	14.10	±	0.20	20.78	±	1.11	6.88	±	0.32	45.09	±	0.17	75.91	±	1.09	25.67	±	0.34	9.86	±	0.15
<b>Ergosterol</b>	2.3	LDL			LDL			LDL			12.79	±	0.08	34.04	±	0.45	19.33	±	0.05	LDL		
<b>Fucoesterol</b>	2.7	1.05	±	0.04	10.10	±	0.20	33.46	±	0.38	34.84	±	0.54	14.92	±	0.03	26.36	±	1.33	12.99	±	0.04
<b>Δ5-Avenasterol</b>	3.8	2.16	±	0.01	LDL			1.81	±	0.11	3.01	±	0.14	3.72	±	0.12	2.67	±	0.03	2.03	±	0.02
<b>Δ7-Estigmasterol</b>	6.3	2.04	±	0.02	29.14	±	0.84	31.00	±	0.13	25.57	±	0.25	29.71	±	0.22	24.43	±	0.94	24.73	±	0.32
<b>β-Sitosterol</b>	7.3	198.34	±	0.36	231.89	±	3.18	227.17	±	0.58	226.44	±	0.92	246.79	±	2.64	293.15	±	1.81	296.48	±	1.52
<b>β-Campesterol</b>	87	60.57	±	0.41	56.90	±	0.32	59.04	±	1.04	61.92	±	0.74	56.33	±	0.30	55.97	±	0.46	65.62	±	0.81
<b>Δ7-Avenasterol</b>	16.9	27.93	±	0.16	29.27	±	0.11	37.16	±	0.24	35.85	±	0.37	30.56	±	0.20	23.08	±	0.21	26.72	±	0.40
<b>Estigmastanol</b>	17.1	3.00	±	0.07	2.18	±	0.17	4.09	±	0.04	4.10	±	0.05	3.47	±	0.10	4.86	±	0.20	3.91	±	0.14
<b>Sitosteril-3-β-glucopiranosido</b>	19.7	54.65	±	0.16	10.51	±	0.17	26.06	±	0.94	22.16	±	0.44	24.98	±	0.35	16.35	±	0.06	30.06	±	0.23
<b>Campesteril-3-β-glucopiranosido</b>	20.1	133.77	±	2.45	10.28	±	0.19	83.37	±	0.76	72.98	±	0.52	73.73	±	0.93	9.92	±	0.24	91.53	±	0.88
<b>Estigmasteril-3-β-glucopiranosido</b>	25.6	3.24	±	0.06	11.71	±	0.23	11.80	±	0.87	3.49	±	0.11	LDL			2.91	±	0.03	2.87	±	0.07
<b>∑ fitoesteroles</b>		500.85	±	3.94	412.78	±	6.52	521.84	±	5.40	548.24	±	4.31	594.16	±	6.42	504.71	±	5.71	566.78	±	4.58

**Cuadro 10. Perfil fitoquímico de fitoesteroles mediante HPLC en germinados de garbanzo cultivar San Antonio inducido químicamente**

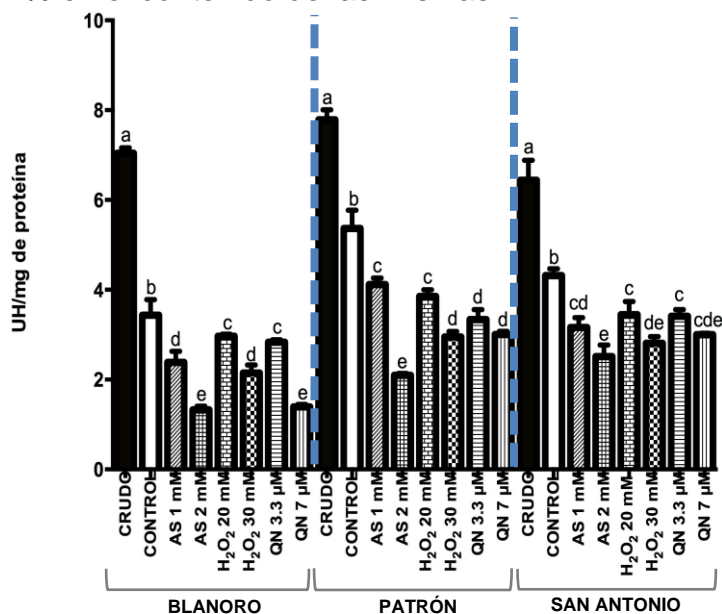
Fitoesteroles (µg/g muestra)	Tiempo de retención	San Antonio - Control			San Antonio-AS 1 mM			San Antonio-AS 2 mM			San Antonio-H2O2 20 mM			San Antonio-H2O2 30 mM			San Antonio-QN 3.3 µM			San Antonio-QN 7 µM		
Brasicasterol	2.1	24.30	±	0.21	23.75	±	0.03	16.82	±	0.53	9.24	±	0.16	18.54	±	0.35	23.25	±	0.79	16.29	±	0.49
Ergosterol	2.3	8.35	±	0.21	4.92	±	0.05	33.16	±	0.60	46.33	±	0.65	34.28	±	0.79	51.69	±	0.90	29.95	±	0.66
Fucosterol	2.7	40.16	±	0.57	93.50	±	1.21	73.68	±	0.51	88.72	±	1.01	75.80	±	1.07	93.76	±	1.01	59.14	±	0.29
Δ5-Avenasterol	3.8	2.60	±	0.02	6.21	±	0.10	6.72	±	0.17	3.50	±	0.15	6.54	±	0.09	1.50	±	0.13	5.04	±	0.06
Δ7-Estigmasterol	6.3	7.00	±	0.04	3.99	±	0.17	3.76	±	0.05	3.71	±	0.10	3.55	±	0.09	10.38	±	0.15	3.37	±	0.16
β-Sitosterol	7.3	149.73	±	1.87	197.94	±	3.74	150.13	±	2.51	196.91	±	3.74	166.38	±	2.31	203.71	±	2.03	255.85	±	1.80
β-Campesterol	87	25.72	±	0.38	30.21	±	0.43	26.10	±	0.75	31.35	±	0.37	27.36	±	0.20	38.58	±	0.10	24.86	±	0.70
Δ7-Avenasterol	16.9	36.04	±	0.67	51.70	±	1.18	30.21	±	0.27	48.96	±	2.10	35.21	±	0.34	37.72	±	0.39	21.02	±	0.86
Estigmastanol	17.1	6.20	±	0.13	8.27	±	0.15	6.44	±	0.13	8.20	±	0.15	6.64	±	0.09	6.92	±	0.20	3.52	±	0.03
Sitosteril-3-β-glucopiranosido	19.7	37.14	±	0.40	30.66	±	0.24	38.52	±	0.49	27.69	±	0.51	24.69	±	0.29	45.57	±	0.36	30.86	±	0.85
Campesteril-3-β-glucopiranosido	20.1	139.09	±	1.39	140.69	±	1.26	146.37	±	1.50	136.15	±	0.72	114.73	±	2.01	151.01	±	1.55	99.98	±	4.30
Estigmasteril-3-β-glucopiranosido	25.6	4.33	±	0.03	1.97	±	0.02	4.33	±	0.01	6.79	±	0.11	5.74	±	0.09	8.64	±	0.14	2.39	±	0.03
Σ fitoesteroles		480.64	±	5.93	593.81	±	8.58	536.24	±	7.53	607.54	±	9.77	519.46	±	7.71	672.73	±	7.75	552.26	±	10.24

Datos se expresan como la media ± DE de cada cultivar. La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC. Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

#### 6.4. Determinación de los componentes antinutricios de los germinados de garbanzo inducidos químicamente

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los contenidos de lectinas, inhibidores de tripsina y ácido fítico, respectivamente. Se observa claramente que la germinación por sí misma disminuyó el contenido de estos tres compuestos antinutricios en los cultivares utilizados respecto a la semilla cruda, mostrando todos una disminución significativa de un 62, 34 y 49%, respectivamente. Esto confirma el hecho de que la germinación disminuye la cantidad de compuestos antinutricios en leguminosas como el garbanzo (El-Adawy, 2002).

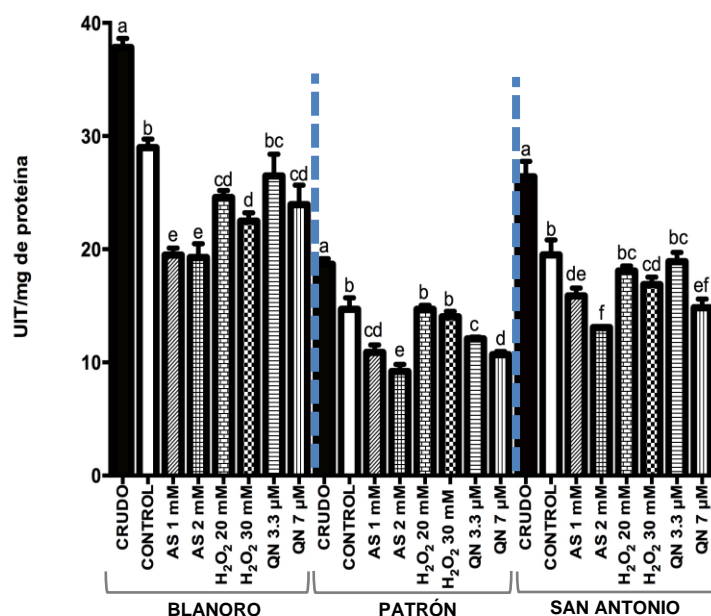
En el caso particular del contenido de lectinas (Figura 6), todos los tratamientos mostraron diferencia estadística disminuyendo dicho contenido respecto al germinado control en los tres cultivares; sin embargo, el tratamiento con AS 2 mM presentó el menor contenido de lectinas respecto al control, disminuyendo alrededor del 62% en el contenido de las mismas.



**Figura 6. Contenido de lectinas en germinados de garbanzo de diferentes cultivares inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.; UH: unidades hemaglutinantes.

De manera similar al contenido de lectinas, todos los tratamientos disminuyeron el contenido de inhibidores de tripsina respecto al control (Figura 7). Cabe destacar el menor contenido (hasta del 34%) de estos inhibidores para el tratamiento de AS 2 mM.



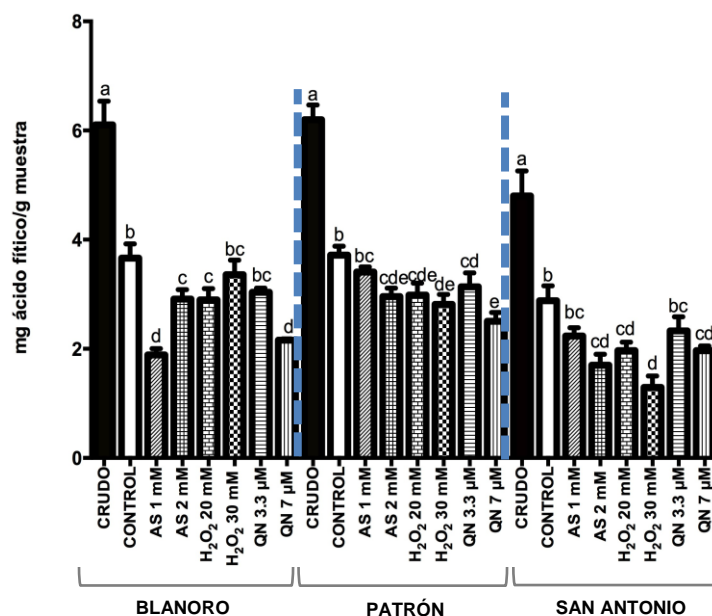
**Figura 7. Contenido de inhibidores de tripsina en germinados de garbanzo de diferentes variedades inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano; UIT: unidades inhibitoras de tripsina.

Por otro lado, si bien el contenido de ácido fítico disminuyó en los tres cultivares respecto al germinado control, la única diferencia significativa observada se encontró en el cultivar Blanoro con los tratamientos de AS 1 mM y QN 7  $\mu$ M, los cuales disminuyeron hasta un 49% el contenido del ácido fítico.

Estos datos nos ayudan a confirmar el hecho de que la inducción química durante la germinación potencia la disminución de compuestos antinutricios en leguminosas. Mejía-Teniente y colaboradores (2010), así como Mendoza-Sánchez

y colaboradores (2016), trabajaron con diferentes condiciones de inducción como AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en frijol común. Estos últimos autores observaron una disminución en el contenido de lectinas, inhibidores de tripsina y ácido fitico entre un 48 y hasta un 57%, mediante la aplicación de QN 7  $\mu$ M durante la germinación de frijol.



**Figura 8. Contenido de ácido fítico en germinados de garbanzo de diferentes cultivares inducidos químicamente.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE de cada cultivar. Letras diferentes indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; QN: quitosano.

### 6.5. Análisis nutricional de los germinados

Una vez realizado el análisis de metabolitos secundarios en los germinados elicitados se procedió a cuantificar componentes relacionados a metabolismo primario de la semilla, los cuales son de importancia nutrimental en las leguminosas. Se eligieron los cultivares que presentaron una mejor respuesta a determinados tratamientos. En el caso del cultivar Blanoro tratado con AS 2 mM, presentó un mayor incremento en el contenido de compuestos fenólicos y

saponinas respecto al control; además con este tratamiento se disminuyó la mayor cantidad de lectinas e inhibidores de tripsina. En el caso del cultivar San Antonio tratado con QN 3.3  $\mu$ M, presentó el mayor incremento en el contenido fitoesteroles. Como se muestra en el cuadro 11, no se encontró diferencia estadística en cuanto al contenido de grasa y cenizas, éstas últimas representan de manera indirecta el contenido de minerales. Si bien no se obtuvo el incremento esperado en estos nutrientes (Jukanti *et al.*, 2012), el hecho de no observar una disminución de los mismos nos sugiere que el metabolismo primario de la semilla no se vio afectado negativamente. Esto, a pesar de que, como se mostró en cuadros anteriores, la semilla presentó una activación de su metabolismo secundario como respuesta a la aplicación de elicitores durante la germinación.

**Cuadro 11. Análisis proximal en germinados de garbanzo de diferentes cultivares inducidos químicamente**

	Humedad	Grasa	Cenizas	Proteína	Carbohidratos
<b>Blanoro</b>					
Semilla cruda	8.98±0.02 <sup>b</sup>	5.57±0.17 <sup>a</sup>	3.48±0.01 <sup>a</sup>	16.84±0.15 <sup>b</sup>	65.13
Germinado control	5.47±0.11 <sup>b</sup>	5.32±0.13 <sup>a</sup>	2.54±0.02 <sup>c</sup>	21.76±0.11 <sup>a</sup>	64.90
Germinado AS 2 mM	11.08±0.10 <sup>a</sup>	5.41±0.18 <sup>a</sup>	2.71±0.04 <sup>b</sup>	20.40±0.92 <sup>a</sup>	60.39
<b>San Antonio</b>					
Semilla cruda	7.60±0.16 <sup>b</sup>	4.69±0.25 <sup>a</sup>	3.21±0.01 <sup>a</sup>	16.87±0.02 <sup>a</sup>	67.62
Germinado control	7.85±0.00 <sup>b</sup>	4.03±0.16 <sup>a</sup>	2.63±0.39 <sup>a</sup>	17.89±0.02 <sup>a</sup>	67.60
Germinado QN 3.3 $\mu$ M	11.50±0.02 <sup>a</sup>	4.65±0.17 <sup>a</sup>	2.81±0.05 <sup>a</sup>	18.15±0.67 <sup>a</sup>	62.90

Control: germinado con agua destilada. Letras diferentes en cada columna indican diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).



Cabe destacar que, comparando el contenido de proteína total de la semilla de la variedad no pigmentada (cv. Blanoro) contra la variedad pigmentada (cv. San Antonio), sí se presentó un incremento significativo entre el 21 y 29% respecto a la semilla cruda. La otra variedad, sin embargo no presentó dicho incremento; pero al no haber diferencias entre la semilla cruda y los germinados estudiados, se sugiere que tampoco se vio afectado su metabolismo primario.

## **6.6 Actividad antioxidante mejorada de germinados de garbanzo a través de inducción química en células Hepa1c1c7**

Una estrategia importante de prevención en materia de salud se basa en la inducción en el organismo de enzimas antioxidantes y de detoxificación (fase 2). Entre las enzimas que destacan se encuentran la glutatión-S-transferasa y la NAD(P)H: quinona oxidorreductasa; dichas enzimas están involucradas en la prevención de carcinogénesis, mutagénesis y procesos relacionados con la toxicidad de algunas moléculas (Fahey *et al.*, 1997).

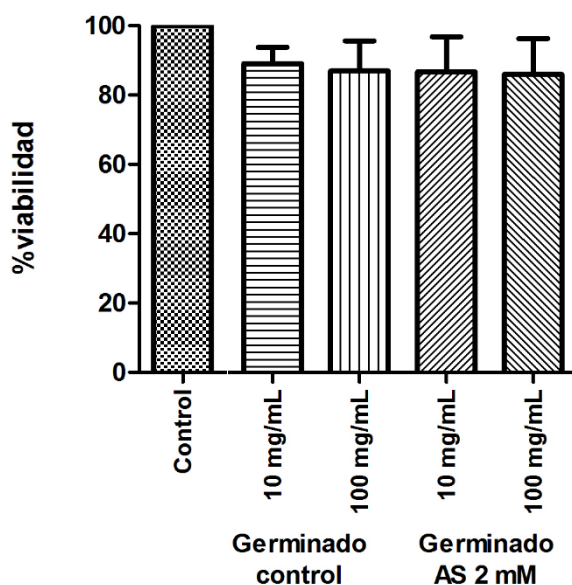
La línea celular de hepatocarcinoma murino Hepa1c1c7 ha sido ampliamente utilizada en ensayos de inducción de enzimas de fase 2 debido a su similitud con tejidos normales; principalmente, presenta la característica de biotransformar los agentes xenobióticos y carcinógenos de manera similar a una célula no transformada, además de presentar una respuesta elevada a la inducción (potencia inductora) de las enzimas mencionadas anteriormente (Fahey *et al.*, 2004)

Debido a lo anterior, es importante evaluar la actividad antioxidante mediante la inducción de enzimas de fase 2 desde un enfoque preventivo con compuestos presentes en la alimentación.

### 6.6.1 Viabilidad celular

Se evaluaron diferentes concentraciones (10-100 mg/mL) de extractos ricos en compuestos fenólicos provenientes tanto de germinados inducidos químicamente como de germinados sin inducción.

Se compararon con un control de células incubadas con medio de cultivo en condiciones basales (suplementado sólo con glucosa 5.5 mM) y no se encontró una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad de las mismas respecto al control, por lo que, para ensayos posteriores, se incluyeron las mismas concentraciones de extractos de prueba (10-100 mg/mL).



**Figura 9. Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante la prueba de MTT con diferentes extractos de germinados inducidos y no inducidos químicamente**

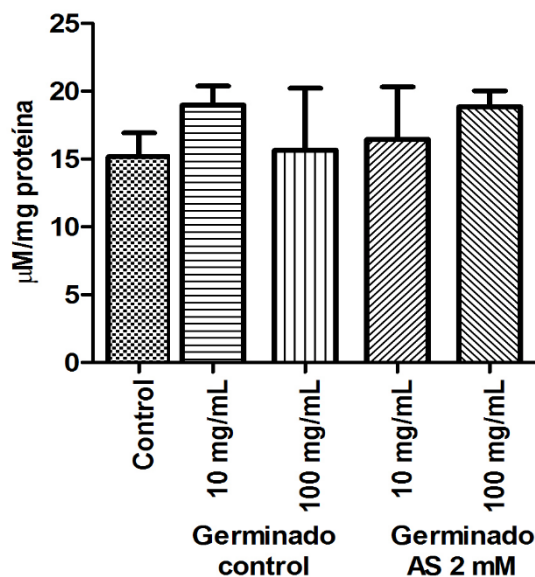
Datos expresados como la media  $\pm$  DE de cada tratamiento. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: Incubado con glucosa a 5.5 mM; Germinado control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; MTT: bromuro de dimetil tiazolil difenil tetrazolio.

Estudios realizados tanto en células hepáticas como adiposas emplearon concentraciones similares (1-100  $\mu\text{g/mL}$ ) de extractos ricos en compuestos fenólicos para evaluar efectos biológicos relativos al aumento en la internalización de glucosa, así como disminución de lípidos intracelulares en dichas células (Cordero-Herrera *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015)

### 6.6.2 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre los niveles de GSH en células Hepa1c1c7

Una vez evaluada la viabilidad celular con diferentes concentraciones de extractos y, al no encontrar una disminución significativa de dicho parámetro, se procedió a evaluar la concentración de GSH intracelular producido.

En la figura 10 se observa que no se produjo un aumento en la concentración de GSH al incubar las células con los extractos respecto al control sin extracto ni entre tratamientos.



**Figura 10. Concentración de GSH en células Hepa1c1c7 incubadas con extractos de germinados de garbanzo.**

Datos expresados como la media  $\pm$  DE de cada tratamiento. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: Incubado con glucosa a 5.5 mM; Germinado control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; GSH: glutatión reducido.

Estudios en otras líneas celulares (macrófagos murinos) muestran un incremento en los niveles de GSH al ocurrir un proceso de estrés oxidativo en las células. Este proceso ocurre al activarse la transcripción mediada por Nrf2 de la subunidad catalítica de la enzima glutamato-cisteín ligasa que participa en la síntesis de GSH (Bea *et al.*, 2003; Tomasi *et al.*, 2014).

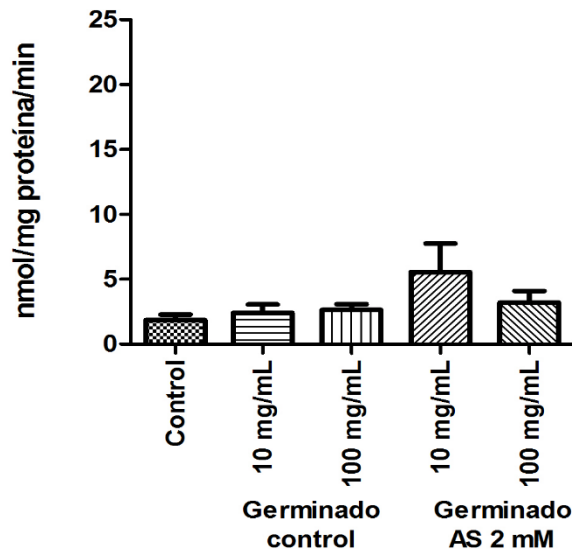
En el caso de la incubación de los hepatocitos con los diferentes extractos de germinado, la evaluación se llevó a cabo en condiciones basales de nutrientes y sin un estímulo externo de estrés oxidativo.

Por lo tanto, los resultados sugieren que las condiciones de incubación con los diferentes extractos utilizados no elevan los niveles de GSH al no tener presente una condición de estrés oxidativo.

### **6.6.3 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre la actividad enzimática de GST en células Hepa1c1c7**

De igual forma, se evaluaron concentraciones de extracto de 10 y 100 mg/mL sobre la actividad de la enzima GST, la cual utiliza al GSH como sustrato para llevar a cabo reacciones de detoxificación en el organismo.

De manera similar a la concentración de GSH presente en las células incubadas con los extractos, no se presentó un incremento significativo en la actividad de GST con los extractos respecto al control ni entre tratamientos (Figura 11).



**Figura 11. Actividad enzimática de GST en células incubadas con extractos de germinados de garbanzo.**

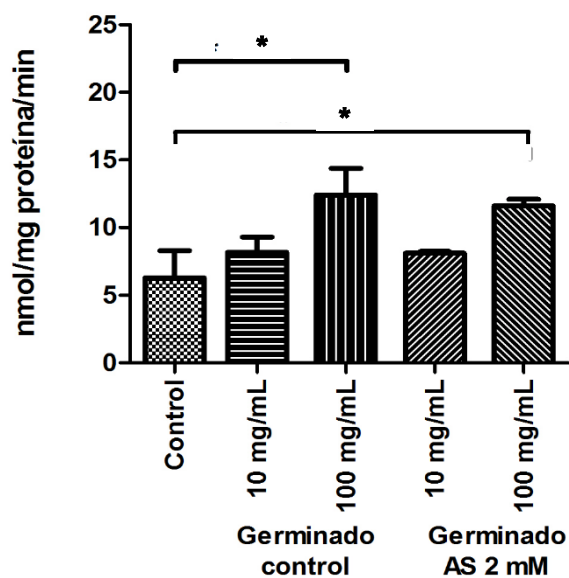
Datos expresados como la media  $\pm$  DE de cada tratamiento. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: Incubado con glucosa a 5.5 mM; Germinado control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; GST: glutatión-S-transferasa.

En este caso, la enzima GST tampoco presentó una actividad elevada respecto a los controles; posiblemente debido a que los tratamientos no indujeron una mayor síntesis de GSH. McWalter y colaboradores (2004) observaron un menor incremento en la actividad de GST respecto a otras enzimas como NQO1 en células Hepa1c1c7 incubadas con sulfurofano 5  $\mu$ mol/L.

#### 6.6.4 Efecto de extractos de germinados de garbanzo sobre la actividad enzimática de NQO1 en células Hepa1c1c7: POTENCIA INDUCTORA

Adicional a las pruebas realizadas, se evaluó la potencia inductora de los extractos de los germinados a través de la actividad de la enzima NQO1.

Como se observa en la figura 12, los extractos, tanto de germinado Control (cv. Blanoro) como el de germinado inducido con AS 2 mM, a una concentración de 100 mg/mL, aumentaron significativamente entre un 97 y 84% la actividad de NQO1, respecto al control. Por otro lado, no se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.



**Figura 12. Actividad enzimática de NQO1 en células Hepa1c1c7 incubadas con extractos de germinados de garbanzo.**

Datos expresados como la media  $\pm$  DE de cada tratamiento. \* Indica diferencia estadística mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Control: Incubado con glucosa a 5.5 mM; Germinado control: germinado con agua destilada; AS: ácido salicílico; NQO1: quinona oxidoreductasa.

En concentraciones de extracto de 100 mg/mL se propone que existe una inducción de sistemas antioxidantes debido al aumento en la actividad de la enzima mencionada (McWalter *et al.*, 2004). Diferentes autores observaron un incremento en la actividad de la enzima NQO1 a nivel hepático tanto *in vitro* como *in vivo* en presencia de sulfurofano (McWalter *et al.*, 2004; Yoxall *et al.*, 2005); sin embargo, no se observó un aumento en la actividad de GST. Ésta diferencia de respuestas podría deberse a la competencia entre factores de transcripción de ambas enzimas o a mecanismos epigenéticos como son las metilaciones (Tan *et al.*, 2010).

Los datos anteriores sugieren un aumento en la actividad de NQO1 al utilizar una concentración mayor de extracto; sin embargo, ese aumento no se vio reflejado al incubar las células con el extracto de un germinado inducido químicamente.



## VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la inducción química de diferentes elicitores sobre la germinación de variedades y cultivares distintos de garbanzo. Se observó que los elicitores no afectan el metabolismo primario de la semilla; mientras que, la aplicación de estos compuestos sí promueven el metabolismo secundario. Los efectos más significativos se presentaron en un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, saponinas y fitoesteroles. Entre los elicitores utilizados, el AS tuvo la tendencia de incrementar el contenido de compuestos fenólicos y saponinas en la variedad no pigmentada. El QN, por su parte, tuvo un mayor efecto en las variedades pigmentadas sobre la síntesis de fitoesteroles. El AS tuvo además un efecto significativo en la disminución de compuestos antinutricios como lectinas, inhibidores de tripsina y ácido fítico. Estos efectos diferenciales de los elicitores sugiere que podrían estar implicados en la activación de distintas vías de señalización de síntesis de metabolitos secundarios de acuerdo a la variedad del garbanzo.

Ahora bien, el obtener materiales con mayor cantidad de compuestos bioactivos y menor cantidad de compuestos antinutricios, permitió evaluar si la inducción química que, evidentemente, tiene un efecto importante en las semillas durante la germinación, podría tener un efecto biológico como antioxidante mayor. Sin embargo, en el rango de las concentraciones utilizadas en el presente estudio no se encontró una mayor actividad antioxidante del germinado asperjado con elicitor (AS 2 mM) respecto del que no fue asperjado. Por otro lado, se pudo corroborar que la germinación es un proceso tecnológico accesible que sí incrementa la actividad de NQO1 entre un 84 y un 97% respecto al control evaluado. Con lo anterior se propone una inducción de sistemas antioxidantes a nivel transcripcional a través de NQO1.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, M. E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. In: Programmed Cell Death in Higher Plants (pp. 185-198). Springer Netherlands.

Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in brassicaceae sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1881-1889.

Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Potential efficacy of broccoli sprouts as a unique supplement for management of type 2 diabetes and its complications. *Journal of Medicinal Food*, 16, 375-382.

Bradford, K. J., & Nonogaki, H. (2007). Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. *Annual Plant Reviews: Seed Development, Dormancy and Germination*, 27, 264-284

Camarena-Gutiérrez, G., & De la Torre-Almaráz, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo*, 13, 157-161

Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.

Cho, E. J., Lee, Y. A., Yoo, H. H., & Yokozawa, T. (2006). Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) against oxidative damage in vitro and in vivo. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 437-444.

Choi, J. H., Jin, S. W., Choi, C. Y., Kim, H. G., Kim, S. J., Lee, H. S., Chung, Y.C., Kim, E.J., Lee, Y.C. & Jeong, H. G. (2017). Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* ameliorate high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 205-212.

Darby, R. M., Maddison, A., Mur, L. A., Bi, Y. M., & Draper, J. (2000). Cell-specific expression of salicylate hydroxylase in an attempt to separate localized HR and systemic signalling establishing SAR in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1, 115-123.

Deschner, E. E., Cohen, B. I., & Raicht, R. F. (1982). The kinetics of the protective effect of  $\beta$ -sitosterol against MNU-induced colonic neoplasia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 103, 49-54.

Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1985). Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal of Food Science*, 50, 905-910.

Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2009). Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 113, 411-419.

Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135, 950-959.

El-Adawy, T. A. (2002). Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57, 83-97.

El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8, 968-987.

Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94, 10367-10372.

Fahey, J. W., Dinkova-Kostova, A. T., Stephenson, K. K., & Talalay, P. (2004). The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQO1. *Methods in Enzymology*, 382, 243-258.

Fan, J., Liu, D., He, C., Li, X., & He, F. (2016). Inhibiting adhesion events by *Panax notoginseng* saponins and Ginsenoside Rb1 protecting arteries via activation of Nrf2 and

suppression of p38–VCAM-1 signal pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 423-430.

Fardet, A. (2015). A shift toward a new holistic paradigm will help to preserve and better process grain products' food structure for improving their health effects. *Food & Function*, 6, 363-382.

Fones, H., & Preston, G. M. (2012). Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 327, 1-8.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Makishima, M., Matsuda, M. & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752-1761.

Gao, Y., Yao, Y., Zhu, Y., & Ren, G. (2015). Isoflavones in chickpeas inhibit adipocyte differentiation and prevent insulin resistance in 3T3-L1 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 9696-9703.

Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry*, 134, 1312-1319.

Gupta, O. P., Nigam, D., Dahuja, A., Kumar, S., Vinutha, T., Sachdev, A., & Praveen, S. (2017). Regulation of Isoflavone biosynthesis by miRNAs in two contrasting soybean genotypes at different seed developmental stages. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-16

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.

Jackman, K. A., Woodman, O. L., & Sobey, C. G. (2007). Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 2824-2830.

Jin, F., Wan, C., Li, W., Yao, L., Zhao, H., Zou, Y., Peng, D., & Huang, W. (2017). Formononetin protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity through enhanced NRF2 activity. *PloS One*, 12,1-13.

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*, 108, 11-26.

Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E., & Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51, 376-382.

Kang, J. S., Kim, S. O., Kim, G. Y., Hwang, H. J., Kim, B. W., Chang, Y. C., Kim W.J. Kim C.M. Yoo, Y.H. & Choi, Y. H. (2016). An exploration of the antioxidant effects of garlic saponins in mouse-derived C2C12 myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 37, 149-156.

Kaukovirta-Norja, A., Wilhemson, A., Poutanen, K. (2004). Germination: a means to improve the functionality of oat. *Agriculture Food Science*, 13, 100–112.

Khalil, A. W., Zeb, A., Mahmood, F., Tariq, S., Khattak, A. B., & Shah, H. (2007). Comparison of sprout quality characteristics of desi and kabuli type chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 40, 937-945.

Le Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C., Payan, F., & Rouge, P. (1997). Characterization and functional properties of the  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343, 31-40.

Limón, R. I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., & Frias, J. (2014). Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Science and Technology*, 56, 328-334.

Liu, H. Y., Cao, S. Y., Hong, T., Han, J., Liu, Z., & Cao, W. (2009). Insulin is a stronger inducer of insulin resistance than hyperglycemia in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Journal of Biological Chemistry*, 284, 27090-27100.

Mao, X., Zhang, L., Xia, Q., Sun, Z., Zhao, X., Cai, H., Yang, X., Xia, Z. & Tang, Y. (2008). Vanadium-enriched chickpea sprout ameliorated hyperglycemia and impaired memory in streptozotocin-induced diabetes rats. *Biometals*, 21, 563-570.

Martín, M. Á., Serrano, A. B. G., Ramos, S., Pulido, M. I., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 196-205.

McWalter, G. K., Higgins, L. G., McLellan, L. I., Henderson, C. J., Song, L., Thornalley, P. J., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. (2004). Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *The Journal of Nutrition*, 134, 3499S-3506S.

Na, H. K., & Surh, Y. J. (2008). Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1271-1278.

Nonogaki, H., Chen, F., & Bradford, K. J. (2007). Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. *Annual Plant Reviews. Seed Development, Dormancy and Germination*, 27, 264-304.

Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13, 179-191.

Peñas, E., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Restani, P., Pihlanto, A., & Frias, J. (2015). Impact of Elicitation on antioxidant and potential antihypertensive properties of lentil sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 401-407.

Pilar, B., Güllich, A., Oliveira, P., Ströher, D., Piccoli, J., & Manfredini, V. (2017). Protective Role of flaxseed oil and flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside against oxidative stress in rats with Metabolic Syndrome. *Journal of Food Science*, 82, 3029-3036.

Pineda, E. G., & Gloria, E. L. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 414-422.

Prochaska, H. J., & Santamaria, A. B. (1988). Direct measurement of NAD (P) H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry*, 169, 328-336.

Ruiz, R. G., Price, K., Rose, M., Rhodes, M., & Fenwick, R. (1996). A preliminary study on the effect of germination on saponin content and composition of lentils and chickpeas. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 366-369.

Saw, C. L. L., Guo, Y., Yang, A. Y., Paredes-Gonzalez, X., Ramirez, C., Pung, D., & Kong, A. N. T. (2014). The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 303-311.

Seida, A., El-Hefnawy, H., Abou-Hussein, D., Mokhtar, F. A., & Abdel-Naim, A. (2015). Evaluation of *Medicago sativa* L. sprouts as antihyperlipidemic and antihyperglycemic agent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 2061-2074.

Serventi, L., Chitchumroonchokchai, C., Riedl, K. M., Kerem, Z., Berhow, M. A., Vodovotz, Y., Schwartz, S.J. & Failla, M. L. (2013). Saponins from soy and chickpea: Stability during beadmaking and in vitro bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6703-6710.

Sharmila, R., Sindhu, G., & Arockianathan, P. M. (2016). Nephroprotective effect of  $\beta$ -sitosterol on N-diethylnitrosamine initiated and ferric nitrilotriacetate promoted acute nephrotoxicity in Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27, 473-482.

Sidhu, G. S., & Oakenfull, D. G. (1986). A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *British Journal of Nutrition*, 55, 643-649.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Świeca, M. (2015). Elicitation with abiotic stresses improves pro-health constituents, antioxidant potential and nutritional quality of lentil sprouts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 409-416.

Tan, X. L., Shi, M., Tang, H., Han, W., & Spivack, S. D. (2010). Candidate dietary phytochemicals modulate expression of phase II enzymes GSTP1 and NQO1 in Human Lung Cells-3. *The Journal of nutrition*, 140, 1404-1410.

Tomasi, M. L., Ryoo, M., Yang, H., Ara, A. I., Ko, K. S., & Lu, S. C. (2014). Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-mediated inhibition of glutathione synthesis in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 148-158.

Vasyukova, N. I., Zinov'Eva, S. V., Il'inskaya, L. I., Perekhod, E. A., Chalenko, G. I., Gerasimova, N. G., Il'ina, A. V., Varlamov, V. P. & Ozeretskoyevskaya, O. L. (2001). Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 103-109.

Wu, Z., Song, L., Feng, S., Liu, Y., He, G., Yioe, Y., Quan, S. & Huang, D. (2012). Germination dramatically increases isoflavonoid content and diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8606-8615.

Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 275-295.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.

Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.



Zhang, L., Li, Q., Yang, X., & Xia, Z. (2012). Effects of sodium selenite and germination on the sprouting of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and its content of selenium, formononetin and biochanin A in the sprouts. *Biological Trace Element Research*, 146, 376-380.

## **ANEXO 1**

### **Preparación de extractos para incubación de células**

Por cada 25 mg de muestra de harina de germinado de garbanzo añadir:

- 500 µL de mezcla acetona: agua (proporción 70: 30)
- Centrifugar a 7,000 g durante 30 s.
- Sonicar la muestra 3 veces durante 15 s dejando reposar 30 s cada vez.
- Centrifugar nuevamente las muestras a 15,000 g durante 5 min.
- Recuperar sobrenadante y colocarlo en un tubo de 1.5 mL.
- Se repite el proceso de extracción con el precipitado y al final se juntan ambos sobrenadantes.
- El sobrenadante obtenido se coloca en un evaporador de vacío hasta que se evapore totalmente el solvente.

El residuo resultante de la evaporación se disuelve en DMSO al 0.5% y se esteriliza por medio de filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm.

## **ANEXO 2**

### **Obtención de homogenados citosólicos**

- Retirar medio de cultivo de la placa
- Lavar con 500 µL de PBS y retirar
- Agregar 200 µL de tripsina e incubar 10 min a 37 °C
- Agregar 300 µL de PBS para inactivar la tripsina
- Recolectar sobrenadante en tubos de 1.5 mL
- Centrifugar a 3,000 rpm por 5 min a 4 °C
- Desechar sobrenadante y añadir 500 µL de PBS
- Introducir al ultracongelador y dejar descongelar 3 veces

\*Nota: Tomar la cantidad de suspensión celular necesaria para las determinaciones. El sobrante (si lo hubiera) se debe guardar de inmediato en el ultracongelador.

### **ANEXO 3**

#### **Solución amortiguadora TRIS 0.2 M, EDTA 0.02 M, pH 8.2**

- Pesar 0.744 g de EDTA
- Pesar 3.152 g de TRIS
- Diluir en matraz aforado de 100 mL con agua destilada
- Ajustar el pH antes de aforar.

### **ANEXO 4**

#### **Solución de DTNB 2.46 mM**

- Pesar 0.0243 g de ácido 5,5'-ditiobis dinitrobenzoico
- Disolver en 25 mL de la solución amortiguadora TRIS-EDTA (anexo 2).

### **ANEXO 5**

#### **Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.5**

- Pesar 1.89 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y disolver en 68.5 mL de agua destilada (0.2 M)
- Pesar 0.895 g de  $\text{NaHPO}_4$  y disolver en 31.5 mL de agua destilada (0.2 M)
- Mezclar ambas soluciones y adicionar 100 mL más de agua destilada
- Ajustar pH.

### **ANEXO 6**

#### **Solución de GSH 3 mM**

- Preparar solución "stock" de GSH 150 mM de la siguiente manera:
  - o Pesar 46.1 mg de GSH y disolver en 1 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M

- Diluir solución de GSH 150 mM con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M (anexo 4) hasta lograr la concentración de 3 mM.

## **ANEXO 7**

### **Solución de CDNB 2 mM**

- Preparar solución “stock” de CDNB 60 mM de la siguiente manera:
  - o Pesar 12.156 mg de CDNB y disolver en 1 mL de etanol puro.
- Diluir solución de CDNB 60 mM con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M hasta lograr la concentración de 2 mM.

## **ANEXO 8**

### **Solución amortiguadora Tris 0.025 M, pH 7.4, suplementada con menadiona**

- Pesar 1.97 g de Tris/HCl
- Pesar 333 mg de BSA
- Colocar en matraz aforado de 500 mL
- Añadir 3.3 mL de Tween al 1.5%
- Aforar con agua destilada
- Esterilizar por filtración y almacenar a temperatura ambiente

Para suplementar al momento de la reacción se añaden por cada 15 mL de solución amortiguadora:

- FAD- 10  $\mu$ L de 6.2 mg/mL
- NADP- 9  $\mu$ L de 38.3 mg/mL
- G6P- 100  $\mu$ L DE 42.3 mg/mL
- G6PD- 30 U
- MTT- 4.5 mg

Justo antes de comenzar la reacción, añadir 15  $\mu$ L de solución de menadiona preparada como se describe:

- Pesar 8.6 mg de menadiona
- Disolver en 1 mL de acetonitrilo.

## **ANEXO 9**

### **Solución amortiguadora con dicumarol (para frenar la reacción)**

- Tomar 4 mL de la solución amortiguadora Tris 0.025 M (anexo 7) sin suplementar
- Añadir 20  $\mu$ L de dicumarol previamente diluido en NaOH 1 N a una concentración de 20 mg/mL.