

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“INDUCCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS NUTRACÉUTICO
EN GERMINADOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y EL EFECTO
DE SU CONSUMO EN UN MODELO DE DISLIPIDEMIA”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

M.C. MAGDALENA MENDOZA SÁNCHEZ

DIRECTOR :

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

CO-DIRECTOR :

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“INDUCCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS NUTRACÉUTICO EN
GERMINADOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y EL EFECTO DE SU
CONSUMO EN UN MODELO DE DISLIPIDEMIA”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. C. Magdalena Mendoza Sánchez

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES


Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Director

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Co-Director


Dr. Jorge Alberto Acosta Gallegos
Asesor

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Asesor

Dr. Abraham Wall Medrano
Asesor



Dra. Silvia Amaya Llano
Director de la Facultad



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



Firma



Firma



Firma



Firma



Firma

Dedicatorias...

Dedico especialmente esta etapa de mi vida a mi amado Dios, todo es posible contigo Señor. Gracias por la vida, gracias por tu infinito amor.

Alex, esposo mío, amigo y fortaleza en todo momento, gracias por ser y estar conmigo en cada instante de esta etapa, para los dos es el comienzo de una nueva y mejor vida. Te Amo, Juntos hasta el fin.

A Cristófer Alex, primero, gracias por ser paciente conmigo hijo, este trabajo lo dedico a ti, porque hemos estado juntos y hemos crecido juntos. Hijo, deseo un día veas cada esfuerzo mío como una muestra de que todo lo que se quiere se puede lograr por amor, y eres tu y tu papi mi fuerza y amor.

A mis padres, siempre lo siento en mi corazón y lo digo con orgullo, lo que soy es el resultado de su amor, sacrificio y esfuerzo. Son los mejores del mundo para mí y mi mejor ejemplo.

A mis hermanos y sus hermosas familias, gracias por su apoyo cada que lo necesite. Los llevo en mi corazón y en mis oraciones siempre están.

Agradecimientos

Agradezco a mi Directora de tesis, Dra. Rosalía, por tanto aprendizaje, por la confianza, por la paciencia, por el apoyo cuando más lo necesite, he logrado esto por que usted siempre ha sido una mujer fuerte y un ejemplo para mi. Dios la bendiga.

Al Doctor Ramón, por sus consejos y el ánimo que siempre mantuvo mi decisión.

A mi comité, Dr. Acosta, Dr. Mercado, Dr. Wall, por estar siempre tan dispuestos a que esto se logrará. Infinitas gracias.

A mis compañeros de laboratorio. Mi estancia en el laboratorio fue maravillosa gracias a personas estupendas como ustedes. Que los éxitos y las bendiciones estén con ustedes.

A carmelita, por la guía, la paciencia y el apoyo que siempre ha ido más allá. Dios le bendiga todo lo que hace por estos alumnos tan distraídos.

RESUMEN

Las dislipidemias son un factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (ECV), principal causa de muerte en México. Se ha propuesto que la alimentación es un elemento clave en el control de la dislipidemia. En México, una de las leguminosas más consumidas es el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual es considerado un alimento importante en el control metabólico de los lípidos. Adicionalmente, se ha reportado que el proceso de germinación de semillas incrementa su valor nutricional y contenido de fitoquímicos, y reduce los niveles de compuestos antinutricios. Adicionalmente, la inducción metabólica es aplicada en plantas para mejorar sus características agronómicas, de resistencia a estrés y composición fitoquímica. Existen estudios en germinados que proponen que este mecanismo mejora las características benéficas de los germinados. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es incrementar la calidad nutracéutica de germinados de frijol mediante la aplicación de quitosano (Q 0.7, 3.3 y 7.0 μM), ácido salicílico (AS 1.0, 1.0, 2.0 mM) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 10, 20 y 30 mM). La primera etapa del trabajo consistió en establecer las condiciones óptimas de germinación con tres variedades, Negro 8025, Pinto Saltillo y Flor de Junio Dalia (FJ Dalia), considerando dos temperaturas (20 y 25 $^{\circ}\text{C}$) y dos humedades relativas (60 y 78 % HR) en un periodo de 1-5 días, evaluando porcentajes de germinación, tamaño de radícula y absorción de agua, obteniendo como condiciones óptimas; 25 $^{\circ}\text{C}$ y 78 %HR y cinco días, teniendo el mejor comportamiento sobre estos tres parámetros la variedad FJ Dalia. Posteriormente se evaluó, en esta variedad, el efecto de los inductores químicos, sobre parámetros de germinación, componentes antinutricios y nutraceuticos. Los resultados obtenidos, mostraron que las concentraciones más altas de cada inductor mejoraron el porcentaje de germinación y el tamaño de radícula de los germinados, así mismo, redujeron el contenido de compuestos antinutricios e incrementaron principalmente los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante mediante DPPH. Posteriormente, mediante un análisis de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS/MS), se obtuvieron perfiles de compuestos polifenólicos, saponinas y fitoesteroles de los germinados, siendo los ácidos cumárico, salicílico, gálico y cafeico, así como los flavonoides epigallocatequina, rutina y quercetina los principales componentes encontrados en los tratamientos de AS. Posteriormente, se seleccionaron los mejores tratamientos, para evaluar el efecto del consumo en un modelo *in vivo* de dislipidemia (Q 7 μM , H_2O_2 30 mM, y AS, 2 y 1 mM). El consumo de germinados, principalmente Q 7 μM , AS, 2 y 1 mM generó pesos significativamente similares al grupo sano. Sin embargo el consumo de germinado control y H_2O_2 30 mM, presentan una ganancia de peso menor que el grupo sano, efecto relacionado a su contenido de compuestos antinutricios. Por otro lado, los germinados disminuyeron de manera importante los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, y mantiene elevados los niveles de colesterol HDL. Sin embargo, este resultado no se mejoró por efecto de la inducción química. Entre los mecanismos relacionados con la disminución de lípidos se encontró que el consumo de germinados inhibe la absorción intestinal de lípidos y que los compuestos a los que se les atribuye este efecto, de acuerdo al análisis estadístico PLS-DA son ácido protocatecuico, ácido hidroxibenzoico, rutina, hesperidina, soyasaponina I y el campesterol 3 β -glocopiranosido, este efecto fue corroborado con el análisis *In silico* que demostró que todos estos compuestos presentan efecto sobre la actividad de la lipasa siendo la, hesperidina y soyasaponina I las que tienen una actividad mayor. Además se encontró que el consumo de germinados activa la oxidación de lípidos e inhibe la beta oxidación en hígado y los compuestos relacionados con este efecto son el ácido caféico, los flavonoides como genisteína y epicatequina, y los fitoesteroles como fucosterol, β -sitosterol y β -campesterol.

ABSTRACT

Dyslipidemia is a major risk factor for atherosclerosis, and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) have been recommended as hypolipidemic coadjuvant due to their high content of phytochemicals, which can be enhanced by germination and elicitation. It has been reported that the germination process increases the nutritional value, enhances the phytochemical content of seeds, and reduces the levels of antinutritional compounds. Chemical induction is applied to plants to improve their agronomic characteristics, stress resistance, and phytochemical composition. There are studies in sprouts that propose that this mechanism improves their beneficial characteristics. Therefore, the objective of this work was to enhance the nutraceutical quality of bean sprouts through the application of chitosan (CH 0.7, 3.3 and 7.0 μ M), salicylic acid (SA 1.0, 1.0, 2.0 mM) and hydrogen peroxide (H_2O_2 10, 20 and 30 mM) and improve their hypolipidemic effect.

The first stage of the work consisted in establishing the optimal conditions of germination of three varieties, Negro 8025, Pinto Saltillo and Flor de Junio Dalia (FJ Dalia), at two temperatures (20 and 25 °C) and two relative humidity (60 and 78% HR) during a period of 1-5 days. We evaluated germination percentages, radicle size and water absorption, and the optimal conditions determined were; 25 °C and 78% RH and five days. The FJ Dalia variety showed the best performance under these three parameters. Then, the effect of chemical inductors on germination parameters, antinutritional and nutraceutical components was evaluated in this variety. The results showed that the highest concentration of each inductor improved the germination percentage and the radicle size of the sprouts, likewise, they reduced the content of antinutritional compounds and increased mainly the phenolic compounds and the antioxidant capacity through DPPH activity. Subsequently, with a liquid chromatography analysis, coupled to a mass spectrometry (UPLC-ESI-MS / MS), profiles of polyphenolic compounds, saponins and phytosterols of the sprouts were obtained, being the coumaric, salicylic, gallic and caffeic acids, and the flavonoids epigallocatechin, rutin and quercetin the main components found in AS treatments. The best treatments were selected to evaluate the effect of consumption in an *in vivo* model of dyslipidemia (7 μ M CH, 30 mM H_2O_2 , and 2 and 1 mM SA). The consumption of germinates, mainly CH 7 μ M, AS, 2 and 1 mM generated weights gain significantly similar to the healthy group. However, the consumption of control germinated and 30 mM H_2O_2 , had a lower weight gain than the healthy group, an effect related to its content of antinutritional compounds.

On the other hand, sprouts significantly decreased levels of triglycerides and LDL cholesterol, and maintained high levels of HDL cholesterol. However, this result was not improved by the effect of chemical induction. It was found that the consumption of sprouts inhibits the intestinal absorption of lipids, according to the statistical analysis PLS-DA. This effect was related to protocatechuic acid, hydroxybenzoic acid, rutine, hesperidin, soyasaponin-I and campesterol 3 β -glucopyranoside. This results were corroborated with an *In silico* analysis that showed that all these compounds have an effect on lipase activity, being hesperidin and soyasaponin I those that have a highest activity. It was also found that the consumption of sprouts activates, in the liver, the oxidation of lipids and inhibits beta-oxidation and the compounds related to this effect are caffeic acid, flavonoids as genistein and epicatechin, and the phytosterols as fucosterol, β -sitosterol and β -campesterol.

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INDICE	iii
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Cuadros.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Dislipidemia.....	3
2.2 Clasificación de la dislipidemia.....	3
2.3 Metabolismo de lípidos y dislipidemia.....	4
2.4 Tratamiento de la dislipidemia.....	10
2.5 Consumo de alimentos con beneficios en el metabolismo de lípidos.....	10
2.5.1 Fríjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y sus beneficios a la salud.....	11
2.6 El proceso de germinación de semillas.....	13
2.6.1 Metabolismo en la germinación.....	14
2.6.2 Factores que afectan la germinación.....	16
2.7 Germinados de leguminosas y su capacidad hipolipidémica.....	18
2.8 Uso de inductores para incrementar compuestos bioactivos durante el proceso de germinación.....	21
2.9 Inducción metabólica generada en respuesta a estímulos exógenos.....	23
2.10 Principales rutas metabólicas activadas en respuesta a la inducción.....	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPOTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos específicos.....	29
VI. METODOLOGÍA	30
6.1 Material biológico y componentes químicos.....	30
6.2 Soluciones de inducción.....	30
6.3 Germinación de las semillas y tratamiento de inducción en los germinados.....	30
6.3.1 Implementación de las condiciones de germinación.....	30
6.3.2 Inducción química de germinados.....	31
6.3.3 Porcentaje de germinación, longitud radicular y porcentaje de absorción de agua.....	31

6.4 Análisis nutricional de los germinados.....	32
6.5 Determinación de los componentes antinutricios de los germinados.....	32
6.5.1 Actividad del inhibidor de tripsina.....	32
6.5.2 Cuantificación de ácido fítico.....	33
6.5.3. Determinación de lectinas mediante hemaglutinación de eritrocitos.....	34
6.5.4. Determinación de inhibidores de alfa amilasa.....	34
6.6 Análisis nutracéutico de los germinados.....	35
6.6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	35
6.6.2 Cuantificación de taninos condensados.....	35
6.6.3 Cuantificación de saponinas totales.....	36
6.7 Perfil de compuestos fitoquímicos mediante el análisis UPLC-ESI-MS/MS y HPLC-ESI-MS.....	36
6.8 Determinación de la capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH	39
6.9 Determinación de las propiedades hipolipidémicas de los germinados de frijol en un modelo <i>in vivo</i>	40
6.10 Evaluación de los mecanismos de acción lipídica de los germinados.....	41
6.10.1 Inhibición de la lipasa pancreática en la absorción de lípidos.....	41
6.10.2 Análisis de simulación docking de la inhibición de la lipasa con compuestos cuantificados mediante HLPC.....	41
6.10.3 Análisis lipidómico por ULPC/MS/MS de hígados de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa.....	42
6.10.4 Cuantificación de la expresión de genes de lipogénesis y beta oxidación en hígado.....	43
6.11 Análisis estadístico.....	44
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Implementación de las condiciones del proceso de germinación de frijol común.	45
7.2 Efecto de la Inducción química sobre el porcentaje de germinación y tamaño de radícula en la variedad Flor de Junio Dalia.....	49
7.3 Efecto de la inducción química sobre el contenido de compuestos anti nutricos del frijol.....	53
7.4 Efecto de la inducción química sobre el contenido de compuestos nutracéuticos y capacidad antioxidante del frijol.....	55
7.5 Composición proximal de germinados de frijol FJ Dalia inducidos químicamente.....	63

7.6 Efecto del consumo de germinados de frijol FJ Dalia inducidos químicamente en un modelo de dislipidemia y su relación con los componentes fitoquímicos presentes en ellos.....	64
7.6.1 Efecto del consumo de los germinados sobre la ganancia de peso corporal en el modelo animal.....	64
7.6.2 Efecto del consumo de germinados inducidos sobre el perfil lipídico de ratas dislipidémicas.....	69
7.6.3 Contenido de triglicéridos en heces e inhibición de lipasa pancreática.....	72
7.6.4 Estudio <i>In sílico</i> de los compuestos fitoquímicos de germinados de FJ Dalia relacionados con la inhibición de lipasa pancreática.....	75
7.6.5 Efecto del consumo de germinados sobre el contenido de lípidos en hígado y su relación con componentes fitoquímicos.....	82
7.6.6 Enzimas de daño hepático.....	84
7.6.7 Expresión de genes relacionados con los procesos de lipogénesis y beta oxidación en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa y tratadas con germinados de frijol.....	86
VIII. CONCLUSIONES.....	89
IX. REFERENCIAS.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. Hidrólisis intestinal de lípidos provenientes de la dieta.....	5
Figura 2. Incorporación de los lípidos de la dieta al quilomicrón.....	6
Figura 3. Almacenamiento y oxidación de lípidos en tejido adiposo.....	7
Figura 4. Metabolismo de lípidos en la dislipidemia.....	9
Figura 5. Proceso de germinación del frijol.....	13
Figura 6. Fases de la germinación y sus principales efectos.....	14
Figura 7. Esquema general del metabolismo de lípidos en la germinación.....	16
Figura 8. Esquema general de inducción de metabolitos de defensa en plantas.....	25
Figura 9. Principales rutas del metabolismo secundario activadas por inducción.....	26
Figura 10. Medición de variable de longitud radicular.....	32
Figura 11. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el proceso de imbibición de las variedades de frijol.....	46
Figura 12. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el tamaño radicular.....	47
Figura 13. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el porcentaje de germinación.....	48
Figura 14. Efecto de las sustancias químicas de inducción sobre la producción adelantada de plántula en Flor de junio Dalia.....	50
Figura 15. Efecto del uso de quitosano (0.7, 3.3 y 7 μ M), ácido salicílico (0.1, 1.0 y 2.0 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM) sobre el porcentaje de germinación en la variedad Flor de junio Dalia.....	51
Figura 16. Efecto del uso de quitosano (0.7, 3.3 y 7 μ M), ácido salicílico (0.1, 1.0 y 2.0 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM) sobre el tamaño radicular en la variedad Flor de junio Dalia. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	53
Figura 17. Componentes principales de, (a) compuestos antinutricios, (b) compuestos nutracéuticos presentes en frijoles inducidos químicamente.....	59
Figura 18. Peso corporal de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementada con germinados de frijol.....	65
Figura 19. Consumo de alimento de ratas dislipidémicas tratadas y controles.....	66
Figura 20. Micrografías de tejido adiposo con tinción de hematoxilina y eosina, en	

ampliación 200X (a), y cuantificación del diámetro de los adipocitos (b), de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementada con germinados de frijol.....	67
Figura 21. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la reducción del peso corporal.....	69
Figura 22. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la reducción del triglicéridos y colesterol total..	72
Figura 23. Contenido de triglicéridos en heces de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol.....	73
Figura 24. Inhibición <i>in vitro</i> de la enzima lipasa pancreática con germinados de frijol.....	74
Figura 25. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la inhibición de la lipasa pancreática.....	75
Figura 26. Acoplamiento molecular entre hesperidina (A, C) y soyasaponina I (B, D) con la lipasa pancreática.....	86
Figura 27. Microfotografías de tejido hepático de los grupos de experimentación. Tinción con hematoxilia y eosina, ampliación 200X.....	83
Figura 28. Efecto de los germinados sobre el contenido de triglicéridos en hígado de los animales alimentados con dieta alta en grasa y fructosa.....	84
Figura 29. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con el contenido de lípidos en hígado.....	88

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Características de las dislipidemias (De acuerdo a la NOM-037-SSA2-2012).....	4
Cuadro 2. Efecto del consumo de frijol común sobre el perfil lipídico en ratas obesas y dislipidémicas.....	12
Cuadro 3. Contenido de humedad para la germinación de algunas semillas de especies cultivadas.....	17
Cuadro 4. Temperaturas cardinales de algunas semillas para el proceso de germinación.....	17
Cuadro 5. Concentración de isoflavonas de una variedad de soya (BRS 258) a diferentes tiempos y temperaturas de germinación.....	19
Cuadro 6. Concentración de antocianinas identificadas en semilla de frijol cruda, germinado y frijol cocido.....	19
Cuadro 7. Efecto de diversos método de procesamiento sobre los niveles de compuestos antinutricios y la digestibilidad proteínica de frijol y procesados.....	21
Cuadro 8. Parámetros matemáticos de los modelos logísticos del porcentaje de germinación y tamaño de radícula.....	51
Cuadro 9. Concentración de compuestos antinutricios en germinados de frijol tratados con diferentes inductores.....	55
Cuadro 10. Concentración de compuestos fenólicos en germinados de frijoles tratados con diferentes inductores.....	57
Cuadro 11. Inhibición porcentual del radical ABTS y DPPH de germinados de frijol Flor de junio Dalia.....	58
Cuadro 12. Perfil de compuestos fitoquímicos de germinados inducidos químicamente.....	61
Cuadro 13. Composición proximal de frijol germinado inducido químicamente.....	63
Cuadro 14. Perfil de lípidos de ratas control y alimentadas con germinados de frijol inducidos.....	70
Cuadro 15. Informática molecular de los fitoquímicos seleccionados de los germinados de FJ Dalia.....	79
Cuadro 16. Datos de acoplamiento molecular entre el rPLRP2 y hesperidina o soyasaponina I.....	80

Cuadro 17. Enzimas relacionadas con daño hepático de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol.....	85
Cuadro 18. Enzimas del metabolismo lipídico en hígado de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol.....	87

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en México y el mundo, en este contexto la dislipidemia es uno de los factores modificables relacionados con las EVC (Jellinger y col. 2012). La dislipidemia se caracteriza por presentarse niveles anormales de lipoproteínas en suero, que incluye la elevación de colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y colesterol LDL (Low Density Lipoprotein), así como la disminución del colesterol HDL (High Density Lipoprotein) (Kolovou y col., 2005). Se ha reportado en algunos estudios que dentro de su tratamiento y prevención, se encuentra la dieta y se pueden considerar a los alimentos de origen vegetal con cantidades elevadas de compuestos bioactivos como una alternativa para su control (Sahebkar y col., 2016; Cicero y Colletti, 2015)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más consumidas en todo el mundo y es considerado como un alimento funcional. Diversos estudios demuestran que el frijol contiene gran cantidad de componentes fitoquímicos (compuestos fenólicos, antocianinas, isoflavonas, fitoesteroles, fitoestrógenos, fibra etc.), los cuales se han relacionado con el control de ciertas enfermedades como las dislipidemias (Ramírez-Jiménez y col., 2015). Sin embargo, presenta la desventaja de contener componentes antinutricios (Doria y col., 2012).

Debido a lo anterior y a que existen reportes de que el proceso de germinación de semillas incrementan la cantidad de componentes nutraceuticos y la biodisponibilidad de componentes químicos como carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales y disminuye el contenido de compuestos antinutricios (Dueñas y col., 2016; López y col., 2013), se sugiere que la germinación del frijol común puede mejorar las propiedades hipolipidémicas de esta leguminosa.

Por otro lado, la inducción metabólica es un mecanismo por el cual se incrementa el sistema de defensa de las plantas mientras que al mismo tiempo se eleva su contenido fitoquímico como parte del metabolismo secundario.

Actualmente existen algunos estudios que demuestran que el uso de inductores exógenos presenta efectos positivos sobre el proceso de germinación de frijol común, como es mejorar las características agronómicas del germinado como índices de germinación y vigor, e incremento de sustancias fitoquímicas de interés, tales como, compuestos fenólicos, lignanos, saponinas, isoflavonoides entre otros (Limón y col., 2013; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011; Anaya y col., 2015; Pérez y col., 2011).

Debido a lo anterior, el propósito de este estudio es evaluar el efecto de inductores químicos sobre el contenido nutricional y nutracéutico de germinados de frijol, y determinar sus propiedades hipolipidémicas y mecanismos de acción en un modelo *in vivo*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Dislipidemia

Actualmente las enfermedades cardiovasculares (ECV) están consideradas dentro de las principales causas de muerte en México y el mundo, siendo la aterosclerosis la ECV de mayor incidencia. La aterosclerosis es un proceso multifactorial constituido por diversos elementos de riesgo, como son la edad, la herencia, el sedentarismo, una dieta no saludable, la obesidad, los niveles elevados de glucosa y las dislipidemias (Jellinger y col., 2012).

Las dislipidemias son trastornos del metabolismo lipídico que se expresan por cambios cuantitativos y cualitativos de las lipoproteínas, determinados por alteraciones en la síntesis, degradación y composición de las mismas y que por su magnitud y persistencia causan enfermedad (Ramasamy, 2016). Se caracterizan por niveles anormales de lipoproteínas en sangre, lo que incluye la elevación de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol LDL (Low Density Lipoprotein) y la disminución del colesterol HDL (High Density Lipoprotein) (Jellinger y col., 2012; Kolovou y col., 2005). Además, es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular modificables, por lo que su escrutinio y tratamiento es costo-efectivo en toda la población mayor de 20 años. Adicionalmente, este factor y la hipertensión arterial se encuentran frecuentemente asociadas, presentando un efecto sinérgico sobre el riesgo cardiovascular (Kolovou y col., 2005).

Por lo anterior, una de las necesidades más importantes para el sector salud, ha sido generar programas que permitan reducir la incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular, y dentro de las estrategias más relevantes se encuentran los programas de prevención (Varady y Jones, 2005).

2.2 Clasificación de la dislipidemia

Las dislipidemias se pueden clasificar según su fenotipo clínico y etiopatogenia. Pueden tener origen genético, ser secundarias a otras patologías

(hipotiroidismo, obesidad, diabetes mellitus, Insuficiencia renal crónica, etc.) o producirse debido a diversos factores ambientales como el sedentarismo, tabaquismo, consumo de dietas ricas en azúcar, grasa y colesterol entre otros (Ramasamy, 2016; Jellinger y col., 2012; Kolovou y col., 2005).

Las dislipidemias se pueden clasificar como se muestra en el Cuadro 1, en el cual se observan sus características principales.

Cuadro 1. Características de las dislipidemias (De acuerdo a la NOM-037-SSA2-2012).

DISLIPIDEMIA	Colesterol Total (CT) (mg/dL)	Triglicéridos (TG) (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)
Hipercolesterolemia	> 200	< 200	≥ 130	-
Hipertrigliceridemia	< 200	> 150	< 130	-
Hiperlipidemia mixta	> 200	> 150	≥ 130	> 160
Hipoalfalipoproteinemia	-	-	-	< 40
VALORES NORMALES	< 200	< 150	< 130	≥ 40

La obesidad y el sedentarismo son considerados factores de riesgo condicionantes de la dislipidemia, dado que su tratamiento puede tener resultados altamente favorables (Jellinger y col., 2012; Munguía-Miranda y col., 2008).

2.3 Metabolismo de lípidos y dislipidemia

Los lípidos presentes en el torrente sanguíneo pueden provenir de tres fuentes principalmente, los alimentos, que son ricos en triglicéridos, fosfolípidos y colesterol; los lípidos provenientes del tejido adiposo, y los generados por síntesis *de novo*. En la dislipidemia ocurren una serie de eventos que terminan por alterar el metabolismo de los lípidos.

Los lípidos provenientes de la dieta al ingresar al organismo se digieren en la boca y estomago por enzimas, sin embargo es en el intestino donde se lleva a cabo el principal proceso de digestión lipídica. En el intestino, la lipasa pancreática (LP) participa de manera importante en la digestión de los lípidos complejos que provienen del estómago, ya que esta enzima en emulsión con los jugos biliares degrada estos lípidos, produciendo glicerol, mono-glicéridos y ácidos grasos libres (Figura 1) (Troyo, 2004).

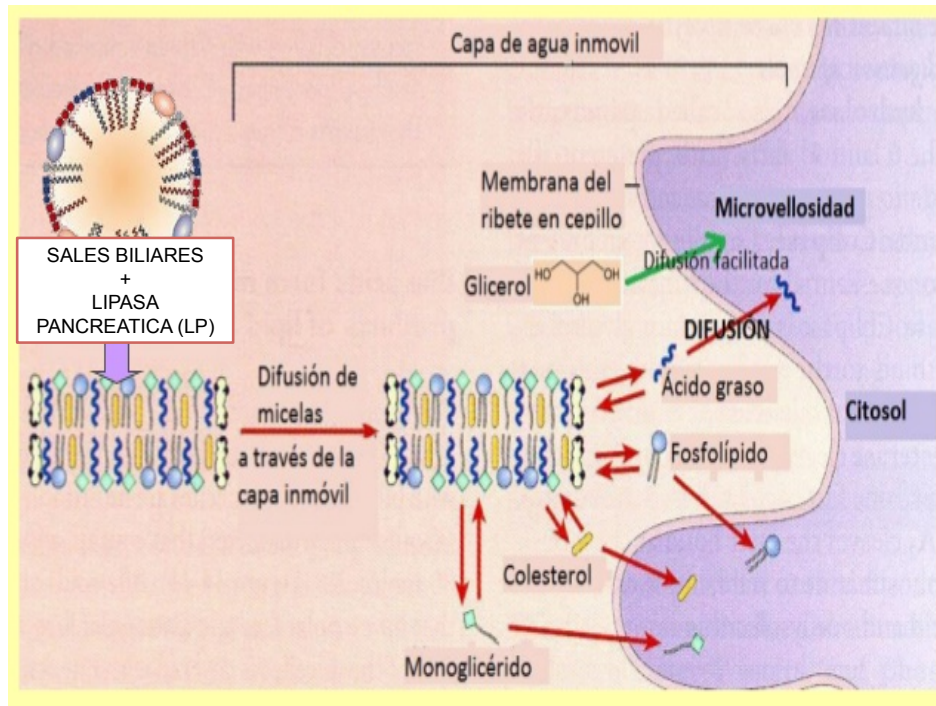


Figura 1. Hidrólisis intestinal de lípidos provenientes de la dieta. (Tomado de Troyo, 2004) .

Esta emulsión e hidrólisis lipídica permite el paso de los lípidos simples a través de las vellosidades intestinales, transportándolos directo a los enterocitos (células del intestino), donde serán re-esterificados en triglicéridos e incorporados en una lipoproteína de transporte llamada quilomicron, la cual tiene la función de transportar los lípidos de la dieta a tejidos periféricos, llevándolos principalmente a musculo y tejido adiposo (Figura 2).

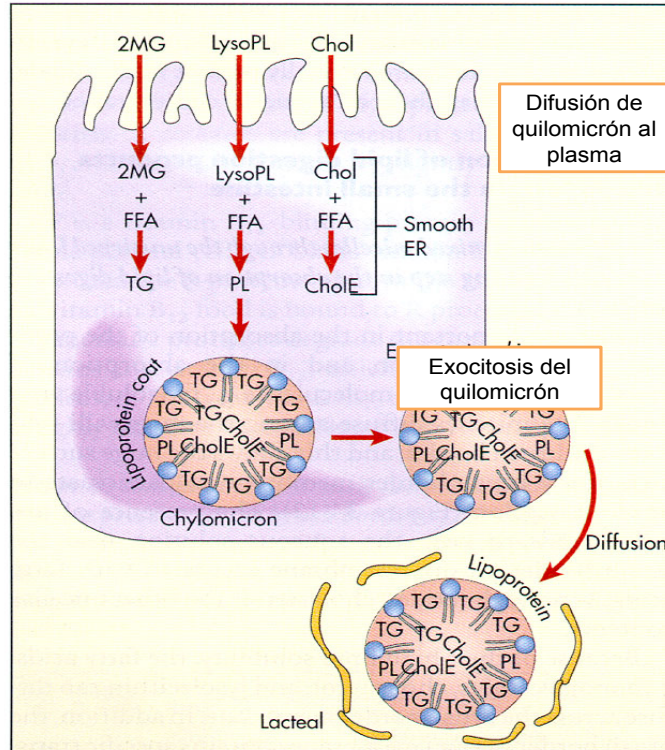


Figura 2. Incorporación de los lípidos de la dieta al quilomicron. Ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), colesterol esterificado (CholE), retículo endoplásmico (ER), monoglicéridos (MG), (Tomado de Troyo, 2004) .

El quilomicron, formado en el intestino, llega al tejido adiposo, donde receptores específicos lo reconocen y lo anclan, vía su Apo-proteína CII (Apo-CII). Una vez unido el quilomicron al tejido adiposo, la Apo-CII activa a la enzima lipoproteína lipasa (LPL), presente en los capilares, donde esta enzima hidroliza los triglicéridos a ácidos grasos libres para su posterior internalización por medio de transportadores como CD36. Posteriormente, los ácidos grasos libres una vez internalizados, son reempaquetados con glicerol en triglicéridos y almacenados en los adipocitos (Figura 3) (Jellinger y col., 2012; Troyo, 2004).

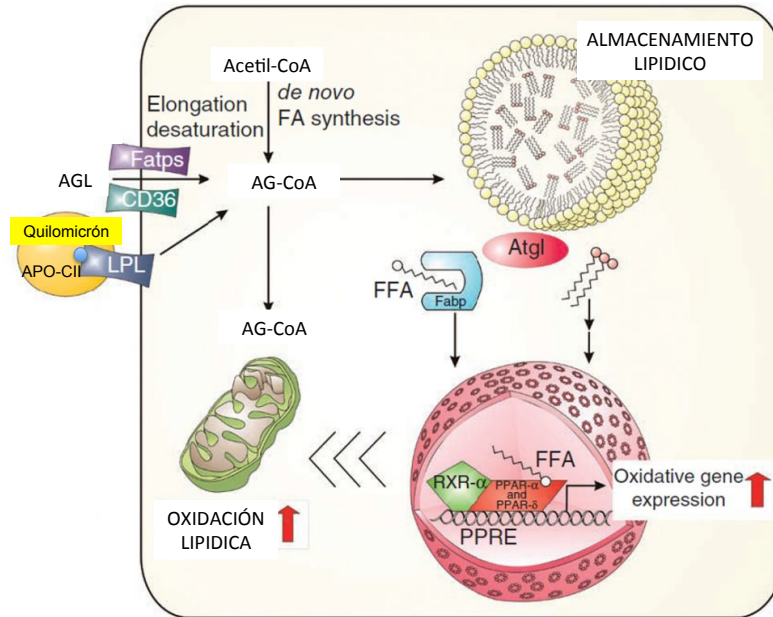


Figura 3. Almacenamiento y oxidación de lípidos en tejido adiposo. (Tomado de Troyo, 2004) .

Por otro lado, un elevado consumo de azúcares en la dieta incrementa la presencia de fructosa en el hígado, lo que activa al factor de transcripción SREBP, cuya función se relaciona con la expresión de la Acetil-CoA-Carboxilasa (ACC) y la Sintasa de Ácidos Grasos (FAS), activándose de esta forma la síntesis hepática de ácidos grasos (lipogénesis o síntesis *de novo*). Adicionalmente, la producción y presencia de ácidos grasos en el hígado activa la síntesis de la lipoproteína de muy baja densidad (Very Low Density Lipoprotein, VLDL), la cual tiene la función de transportar los ácidos grasos hepáticos, esterificados en triglicéridos, hasta al tejido adiposo y otros tejidos periféricos. Una vez que el tejido adiposo reconoce a la VLDL vía su apoproteína de reconocimiento (Apo-CII), nuevamente se activa la enzima lipoprotein lipasa (LPL) que hidroliza los lípidos de VLDL para su internalización y almacenamiento (Figura 3) (Jellinger y col. 2012; Troyo, 2004).

Después de que VLDL entrega lípidos a los tejidos, se genera una lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y posteriormente la lipoproteína de baja densidad (LDL) rica en colesterol y ésteres de colesterol, que circula por el torrente

sanguíneo hasta llegar a hígado, donde es reconocida por su receptor específico (LDL). El colesterol unido a LDL es liberado dentro del hígado y el resto de LDL es internalizado para su posterior degradación. Adicionalmente, elevadas concentraciones de colesterol en hígado activan a la enzima colesterol-7-alfa-hidroxilasa (CYP7A) involucrada en la producción de ácidos biliares, estos son liberados al intestino para emulsificar las grasas y parte de estos son eliminados en las heces (Jellinger y col. 2012; Troyo, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que diversos factores físicos, ambientales, biológicos y genéticos, conllevan a un incremento de grasa corporal, la cual se almacena en tejido adiposo abdominal y visceral. El exceso de grasa gradualmente origina cambios en la estructura de los adipocitos (células del tejido adiposo), generando finalmente el crecimiento de los adipocitos, estado conocido como hipertrofia. La hipertrofia por un lado puede alterar las funciones de almacenamiento del tejido adiposo y por otro lado, generar resistencia a la insulina (RI) en el mismo. Estos dos efectos producen un incremento de ácidos grasos libres en la sangre como consecuencia de la activación de la lipólisis en los adipocitos donde la enzima lipasa sensible a la hormona (LSH) participa activamente liberando ácidos grasos libres al torrente sanguíneo (Figura 4) (Langin, 2006; Zimmermann y col., 2009).

Adicionalmente, en el hígado un estado de resistencia a la insulina ocasionada por obesidad, produce modificaciones en el metabolismo de los lípidos dentro del hepatocito (célula del hígado). La síntesis *de novo* de ácidos grasos, regulada independientemente por la insulina parece incrementada en la resistencia a esta hormona, puesto que la hiperinsulinemia induce en el hígado a SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*), la cual activa transcripcionalmente la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis (entre ellos ACC y FAS) e incrementa el riesgo de esteatosis hepática no alcohólica (hígado graso) (Stoeckman y Towle, 2002).

2.4 Tratamiento de la dislipidemia

Entre los tratamientos usados para disminuir la patología de las dislipidemias se encuentra el uso de diversos fármacos, como las estatinas, fibratos, resinas y derivados del ácido nicotínico, sin embargo, estos tratamientos son dependientes del tipo de dislipidemia a tratar y pueden presentar la limitante de la incompatibilidad con otros medicamentos, sobre todo si el paciente con dislipidemia presenta algún otro padecimiento como hipotiroidismo, diabetes, menopausia etc., y se mantiene con tratamiento para los mismos. Por otro lado, el sector de salud recomienda primeramente tratamientos no farmacológicos, como cambios en el estilo de vida y de manera importante tener un régimen especial en la dieta, el cual es definido de acuerdo al tipo de dislipidemia que se trate (Varady y Jones, 2005).

2.5 Consumo de alimentos con beneficios en el metabolismo de lípidos

Se ha reportado que una gran cantidad de componentes fitoquímicos ejercen efectos fisiológicos sobre el metabolismo de los lípidos, en este sentido, la dieta se ha convertido de manera importante en una estrategia de prevención y control de la hiperlipidemia (Lombardo y col., 2011; Aissaoui y col., 2012; Mohamed, 2014).

Dentro de los alimentos de origen vegetal más ampliamente consumidos destacan los granos y leguminosas, las cuales han sido actualmente estudiadas por su contenido de compuestos nutraceuticos y la relación que han presentado con diversas enfermedades, entre ellas la dislipidemia (Carbonaro y col., 2015; Sahebkar y col., 2016).

Sirtori y col. (2009) reportaron los efectos del consumo de diversas leguminosas sobre parámetros bioquímicos del metabolismo de lípidos en ratas. El consumo de leguminosas como soya (*Glycine max*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y lupinos (*Lupinus albus*) presentan una reducción importante de los niveles de

colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos, así como un incremento en los niveles de colesterol HDL, a excepción de la soya.

Lo anterior sugiere que las leguminosas son una fuente importante de componentes funcionales, los cuales tienen impacto en la reducción del riesgo cardiovascular, al disminuir el efecto de factores como la dislipidemia.

2.5.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y sus beneficios a la salud

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más consumida a nivel mundial, formando parte de la dieta base de múltiples culturas. Esta leguminosa se caracteriza por ser una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, vitaminas, minerales y fitoquímicos (Suárez-Martínez y col., 2016).

Adicionalmente, el frijol común contiene componentes bioactivos con beneficios a la salud. Los fitoquímicos más relevantes de esta leguminosa comprenden compuestos fenólicos, polisacáridos no digeribles, péptidos bioactivos, inhibidores enzimáticos, saponinas, fitoesteroles entre otros (Díaz-Batalla y col., 2006; Queiroz-Monici y col., 2005).

Particularmente, el frijol común se ha considerado como un agente hipolipidémico (Ramírez-Jiménez y col., 2015) debido a sus diversas propiedades dentro de las que destacan las hipocolesterolémicas (Han y col., 2003, Han y col., 2004), reducción de consumo de alimentos (Fantini y col., 2009; Nilsson y col., 2013; Spadafranca y col., 2013) e inhibición de la absorción intestinal de lípidos (Han y col., 2005; Chávez-Santoscoy y col., 2013; Chávez-Santoscoy y col., 2014).

En un estudio realizado por Zhu y Thompson (2012), se evaluó el efecto del consumo de una dieta adicionada con frijol para el consumo de ratas con obesidad inducida con dieta rica en grasas. En el Cuadro 2 se observa que los niveles de colesterol LDL y triglicéridos se disminuyeron, sin afectar los niveles del colesterol HDL, así mismo, se observó que hubo una disminución del peso

corporal en las dietas con mayor porcentaje de frijol 60 %.

Cuadro 2. Efecto del consumo de frijol común sobre el perfil lipídico en ratas obesas y dislipidémicas. TC, Colesterol total; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, Colesterol LDL. (Modificado de Zhu y Thompson, 2012)

Dietary beans (%)	TC (mmol/l)		HDL-C (mmol/l)		HDL-C/TC (%)		LDL-C (mmol/l)		TAG (mmol/l)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0	2.17 ^a	0.05	1.37 ^a	0.05	63 ^a	2	0.62 ^a	0.05	0.85 ^{a,b}	0.06
7.5	2.33 ^a	0.10	1.50 ^a	0.13	65 ^a	4	0.59 ^{a,b}	0.08	1.13 ^a	0.14
15	2.17 ^{a,c}	0.08	1.42 ^a	0.08	65 ^a	4	0.54 ^{a,b}	0.10	1.11 ^a	0.08
30	1.91 ^{b,c}	0.08	1.29 ^a	0.05	67 ^a	2	0.49 ^{a,b}	0.05	0.64 ^b	0.05
60	1.81 ^b	0.10	1.29 ^a	0.10	70 ^a	2	0.39 ^b	0.05	0.78 ^{a,b}	0.09
<i>P</i>	<0.0001		0.354		0.383		0.030		0.005	

Adicionalmente, diversos estudios han reportado el efecto hipolipidémico de la fibra dietaria y el almidón resistente del frijol, en este sentido, se ha propuesto que la fibra dietaria mejora la concentración de lipidos en sangre debido al potencial de atrapamiento físico de lípidos y a la inhibición parcial de la absorción intestinal de colesterol (Sánchez-Muñiz, 2012).

El frijol común también es una fuente importante de almidón resistente. Se ha reportado que este componente disminuye la absorción y uso de grasa mediante su atrapamiento en sales biliares y el estímulo de saciedad, lo cual también tiene un impacto directo sobre la concentración sanguínea de lípidos (Tapsell, 2004; Han y col., 2003).

Por otro lado el contenido de fitoesteroles en el frijol, también ha demostrado inhibir la absorción de colesterol en el intestino incrementando su excreción fecal (Ostlund, 2004). Estudios recientes demuestran que el consumo de fitoesteroles presentes en la corteza de frijol, inhiben la solubilidad micelar del colesterol por tanto su absorción intestinal se ve disminuida. Así mismo se ha reportado una disminución en la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS) y SREBP1, ambos genes lipogénicos, y un incremento en la transcripción de CPT1, promotor de la beta oxidación (Chávez-Santoscoy y col., 2014).

Aunado a lo anterior, se ha reportado que los germinados de semillas podrían representar un beneficio a la salud en la prevención y tratamiento de diversos padecimientos, debido a la gran cantidad de componentes nutritivos biodisponibles y nutracéuticos que estos contienen (Marton y col., 2010).

2.6 El proceso de germinación de semillas

La germinación de la semilla, es definida como el conjunto de reacciones metabólicas que generan cambios bioquímicos y estructurales en la semilla, y que culminan con la emergencia total de la radícula, indispensable para el desarrollo de la futura planta (Figura 5).

La germinación comienza con la absorción de agua de la semilla seca y termina con la elongación del eje embrionario (protusión o crecimiento de radícula) (Rosental y col., 2014).



Figura 5. Proceso de germinación del frijol.

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 (Bradford y Nonogaky, 2007).

En la etapa de imbibición, ocurre una absorción deliberada de agua, una vez que el agua penetra a través de las paredes y las membranas celulares, se liga por uniones de hidrógeno a carbohidratos, proteínas y otras sustancias eléctricamente cargadas, formando coloides.

La segunda etapa del proceso de germinación, también conocida como activación del metabolismo. En esta etapa se desarrollan procesos de respiración, síntesis de proteínas y degradación de componentes macromoleculares (almidón, lípidos y proteínas), para su posterior movilización. Posteriormente, para iniciar el crecimiento del embrión, los componentes de reserva que han sido degradados en la etapa anterior, se movilizan. Al final de esta tercera etapa, el embrión dispone de suficientes nutrientes para crecer normalmente (Figura 6) (<http://www.seedbiology.de/water.asp>).

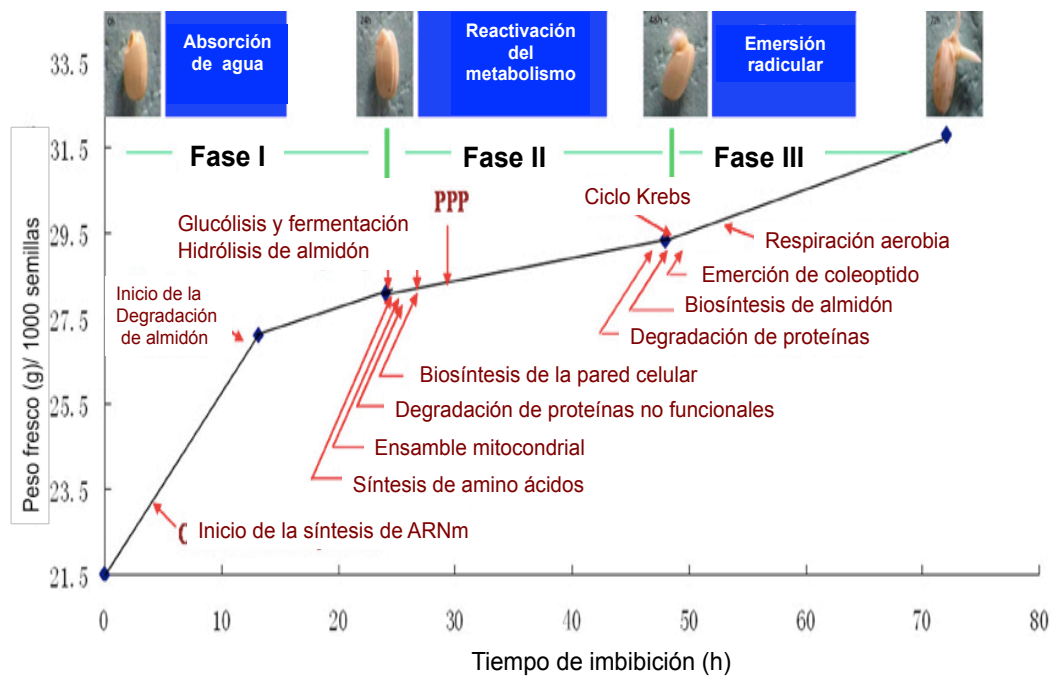


Figura 6. Fases de la germinación y sus principales efectos. Tomado de <http://www.seedbiology.de/water.asp>

2.6.1 Metabolismo en la germinación

El metabolismo de la germinación da inicio en la segunda etapa del proceso germinativo con la respiración. La respiración tiene dos funciones principales en la germinación, la oxidación de sustratos para la producción de energía y la conversión de estos sustratos en intermediarios necesarios para la biosíntesis de componentes. La respiración consiste de un conjunto de rutas metabólicas

que convergen en el ciclo del ácido tricarboxílico y finalmente en la cadena transportadora de electrones (Nonogaki, 2008).

En la germinación el metabolismo de los carbohidratos predominante es la ruta de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. La glucólisis es una ruta que provee aproximadamente el 30 % del carbono a la ruta del ácido tricarboxílico, mientras que, la vía de las pentosas fosfato tiene un papel importante en la provisión de NADP reducido para la biosíntesis de intermediarios, así mismo provee de ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos y eritrosa-4-fosfato para la síntesis de componentes que participan en la vía del ácido shikimico (Botha y Potgieter, 1992).

Aunque la hidrólisis proteica es muy activa en la germinación, existe poca evidencia de que las proteínas sean usadas como sustrato para la respiración, los aminoácidos resultantes de este proceso son movilizados para la producción de nuevas proteínas (Botha y Potgieter, 1992).

Por otro lado, existen evidencias que demuestra que los lípidos presentes en la semilla (cotiledones y embrión) son las principales macromoléculas usadas como sustrato en la respiración. Los ácidos grasos son hidrolizados a Acetil-CoA a través de la beta oxidación, proceso que ocurre en los glioxisomas, donde hay una gran inducción de la enzima Isocitrato Liasa (ICL). El acetil CoA resultante será metabolizado a través del ciclo del glioxalato en succinato para posteriormente catabolizarse a malato en la mitocondria y participar finalmente en la gluconeogénesis para la síntesis de azúcares o la producción de ATP en la mitocondria mediante el ciclo del ácido tricarboxílico (Nonogaki, 2008).

Cuadro 3. Contenido de humedad para la germinación de algunas semillas de especies cultivadas.

Semilla	Contenido de humedad (%)
Maíz (Zea mays)	30.5
Soya (Glycine max)	50.0
Remolacha (Beta ssp.)	31.0
Higuerilla (ricinus comunis)	32-36
Arroz (Oryza sativa)	32-35
Maní (Arachis hypogaea)	32-36
Algodón (Gossypium spp.)	50-55

Cuadro 4. Temperaturas cardinales de algunas semillas para el proceso de germinación.

Semilla	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Arroz	10-12	30-37	40-42
Maíz	8-10	32-35	40-44
Trigo	3-5	15-31	30-43
Tomate	20	20-35	35-40
soya	8	32	40

Otro de los factores externos de importancia es la luz, la exposición a la misma estimula la germinación de semillas de muchas especies silvestres y agrícolas. En la gran mayoría de los casos se estimula la germinación mediante exposición a luz roja (660 nm = 6600 Å) y se inhibe con luz de 730 nm de longitud de onda. En esta reacción a condiciones lumínicas está involucrado el fitocromo, a este tipo de semillas se las denomina fotoblásticas. En un gran número de especies la necesidad por luz puede ser reemplazada por tratamientos con ácido giberélico (Hartman y Kester, 1968; Besnier, 1989)

2.7 Germinados de leguminosas y su capacidad hipolipidémica

No existen estudios *in vivo* que hayan evaluado el efecto de germinados de leguminosas sobre dislipidemias, sin embargo, recientemente se ha reportado que el consumo de germinados de diversas semillas tiene efectos en el control de lípidos. En un estudio realizado por Bahadoran y col.(2012), se evaluó el efecto del consumo de harinas de germinados de brócoli en pacientes con diabetes tipo 2, observando una reducción significativa de los triglicéridos en suero y niveles de LDL.

En un estudio realizado por Paucar-Menacho y col. (2010), se determinó el contenido de isoflavonas, en germinados de soya, a diferentes tiempos y temperaturas de germinación. Los resultados demostraron que la germinación incrementó los componentes bioactivos entre los cuales se encuentran las isoflavonas, y que la concentración de las mismas será dependiente del tiempo y la temperatura de germinación (Cuadro 5).

En el Cuadro 6 se muestra la concentración de antocianinas en frijol germinado comparado con frijol cocido y semilla cruda. Se puede observar que hay compuestos identificados en el germinado que no se encuentran en la semilla, ni en el frijol cocido (Petunidina feruloil glucosa, derivado de la petunidina y derivado de malvidina), así como la pelargonidina 3,5-diglucosido, delphinidina 3-glucosido. Lo que sugiere que en el proceso de germinación incrementa la calidad nutracéutica (Paucar-Menacho y col., 2010).

Cuadro 5. Concentración de isoflavonas de una variedad de soya (BRS 258) a diferentes tiempos y temperaturas de germinación.

Isoflavone (mg/100 g)	Raw	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Aglycones</i>												
Daidzein	11.0	5.7	3.5	8.3	45.3	3.1	13.8	2.9	15.2	12.7	12.6	13.0
Genistein	14.4	7.5	5.3	9.9	45.0	3.6	16.7	5.8	17.8	14.5	15.0	14.5
Glycitein	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>β-Glucosides</i>												
Daidzin	42.5	65.4	29.5	37.4	57.6	30.9	33.1	36.5	24.1	38.8	40.3	38.6
Genistin	36.1	31.9	32.8	31.2	29.3	27.7	36.9	33.3	23.8	33.9	34.5	35.1
Glycitin	10.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acetylglucosides</i>												
Acetyl daizin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetylgenistin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetylglycitin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Malonylglucosides</i>												
Malonyldaidzin	131.6	171.9	139.7	124.3	123.6	165.3	119.4	136.8	115.8	122.9	122.5	122.1
Malonylgenistin	100.8	57.6	36.4	38.2	8.0	57.4	38.1	38.7	35.8	29.6	31.5	29.5
Malonylglycitin	42.0	113.2	148.0	111.2	28.6	116.6	104.2	126.9	46.2	110.7	108.6	110.8
Total aglycone	26.7	13.1	8.8	18.2	90.3	6.7	30.5	8.7	33.0	27.3	27.5	27.5
Total isoflavone	390.0	453.1	395.2	360.4	337.5	404.6	362.0	380.9	278.8	363.2	364.9	363.6

Tiempo y temperatura de los experimentos. 1–(21h, 20 °C), 2–(63 h, 20 °C), 3–(21 h, 30 °C), 4–(63 h, 30 °C), 5(12 h, 25 °C), 6–(72 h, 25 °C), 7–(42 h, 18 °C), 8–(42 h, 32 °C), 9 – (42 h, 25 °C), 10–(42 h, 25 °C) and 11–(42 h, 25 °C). (Pauca-Menacho y col., 2010).

Cuadro 6. Concentración de antocianinas identificadas en semilla de frijol cruda, germinado y frijol cocido.

Compounds (µg/g)	Raw	Boiled	Germinated
Pelargonidin 3,5-diglucoside	Traces	Traces	30.46 ± 1.85
Delphinidin 3-glucoside	3.55 ± 0.18	2.31 ± 0.14	15.87 ± 1.59
Cyanidin 3-glucoside	88.44 ± 3.87	28.44 ± 1.06	9.12 ± 1.05
Pelargonidin 3-glucoside	50.72 ± 2.42	14.25 ± 1.58	nd
Delphinidin 3-glucoside acylated	0.11 ± 0.02	nd	nd
Pelargonidin 3-glucoside acylated	0.38 ± 0.02	nd	nd
Pelargonidin malonylglucoside	0.48 ± 0.03	1.45 ± 0.11	nd
Petunidin feruloyl glucose	nd	nd	58.76 ± 2.38
Petunidin derivative	nd	nd	11.88 ± 1.08
Malvidin derivative	nd	nd	17.64 ± 1.67

nd: no detectado (Lopez y col., 2013).

En otro estudio realizado por Guajardo y col. (2012a) se evaluó el contenido de compuestos fenólicos en extractos de frijol negro durante cinco días de germinación. Se observó que la concentración de estos compuestos es dependiente del tiempo de germinación. Por otro lado, en un estudio realizado por Guajardo y col. (2012b), se evaluó el contenido de saponinas y flavonoides en germinados de frijol, cotiledón del germinado y su cubierta (pericarpio), y se encontró que el mayor contenido de saponinas se encuentra en el germinado total comparado con el cotiledón y cubierta. En comparación con las semillas se ha establecido que los germinados presentan proteínas con mayor valor biológico; alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, elevado contenido de vitaminas y minerales, y polisacáridos biológicamente disponibles (Sangronis y Machado, 2007; Mbithi y col., 2001; Sangronis y col., 2006).

Otro aspecto importante que se debe resaltar en estos alimentos, es que durante la germinación disminuyen los componentes antinutricios como; inhibidores de tripsina, ácido fítico, y taninos (Sangronis y Machado, 2007).

En un trabajo realizado por Shimelis y Rakshit (2007), se reportó el efecto de diferentes tipos de procesamiento sobre algunos componentes antinutricios del frijol y la digestibilidad proteica. Como se muestra en el Cuadro 7, el proceso de germinación reduce significativamente los componentes antinutricios e incrementa los porcentajes de digestibilidad proteica, así mismo la germinación seguida de un proceso de calentamiento por autoclave disminuye hasta niveles indetectables los componentes antinutricios (inhibidores de tripsina, quimi tripsina y ácido fítico) y sus proteínas alcanzan porcentajes de digestibilidad del 100%.

A pesar de que la germinación incrementa el contenido de fitoquímicos y disminuye a los compuestos antinutricios no existen estudios que evalúen los posibles efectos benéficos a la salud que podría tener el consumo de germinados de frijol sobre el metabolismo de lípidos, por lo cual aún es necesario profundizar en estos estudios.

Cuadro 7. Efecto de diversos método de procesamiento sobre los niveles de compuestos antinutricios y la digestibilidad proteínica de frijol y procesados (frijol sin procesar, frijol en remojo, frijol cocido y germinados de frijol Shimelis y Rakshit, 2007)

Treatment	Raffinose (g/100 g) (d.m.)	Reduction ^a (%)	Stachyose (g/100 g) (d.m.)	Reduction ^a (%)	Total α -galactosides (g/100 g) (d.m.)	Reduction ^a (%)	Sucrose (g/100 g) (d.m.)	Reduction ^a (%)
Unprocessed seeds (control)	0.34 ± 0.01 ^a		1.24 ± 0.06 ^a		1.58 ± 0.05 ^a		2.68 ± 0.01 ^c	
Water soaking (12 h in plain water)	0.22 ± 0.05 ^b	35	0.71 ± 0.01 ^b	43	0.93 ± 0.06 ^b	41	2.12 ± 0.07 ^g	21
Sodium bicarbonate soaking (12 h)	0.21 ± 0.02 ^b	38	0.66 ± 0.04 ^b	47	0.86 ± 0.01 ^b	46	2.00 ± 0.02 ^{gh}	25
Sprouting for 24 h	0.21 ± 0.01 ^b	38	0.53 ± 0.03 ^{cd}	57	0.73 ± 0.01 ^c	54	3.93 ± 0.04 ^d	47 ^b
Sprouting for 48 h	0.18 ± 0.03 ^c	47	0.13 ± 0.04 ^e	90	0.31 ± 0.02 ^f	80	4.57 ± 0.02 ^a	71 ^b
Sprouting for 72 h	ND	100	ND	100	ND	100	4.35 ± 0.01 ^b	62 ^b
Sprouting for 96 h	ND	100	ND	100	ND	100	4.21 ± 0.01 ^c	57 ^b
Cooking of un soaked seeds	0.19 ± 0.07 ^c	44	0.62 ± 0.02 ^b	50	0.81 ± 0.08 ^b	49	1.36 ± 0.03 ⁱ	49
Water soaking + cooking	0.18 ± 0.04 ^c	47	0.47 ± 0.03 ^c	62	0.64 ± 0.03 ^d	60	1.13 ± 0.06 ^j	58
Sodium bicarbonate soaking + cooking	0.16 ± 0.09 ^d	53	0.45 ± 0.01 ^c	64	0.61 ± 0.02 ^d	61	0.99 ± 0.01 ^k	63
Autoclaving un soaked seeds	0.14 ± 0.02 ^d	59	0.41 ± 0.07 ^c	67	0.55 ± 0.01 ^{de}	65	0.52 ± 0.02 ^j	81
Soaking (H ₂ O) + autoclaving	0.12 ± 0.08 ^e	65	0.30 ± 0.02 ^d	76	0.41 ± 0.04 ^e	74	0.86 ± 0.09 ^j	68
Soaking (NaHCO ₃) + autoclaving	0.08 ± 0.05 ^f	77	0.29 ± 0.01 ^d	77	0.36 ± 0.09 ^e	77	0.68 ± 0.01 ^m	75
Sprouting for 24 h + autoclaving	0.15 ± 0.03 ^d	56	0.12 ± 0.05 ^e	90	0.27 ± 0.08 ^f	83	1.82 ± 0.04 ^h	32
Sprouting for 48 h + autoclaving	0.08 ± 0.04 ^f	76	0.06 ± 0.07 ^f	95	0.14 ± 0.09 ^g	91	2.39 ± 0.05 ^f	11
Sprouting for 72 h + autoclaving	ND	100	ND	100	ND	100	2.17 ± 0.02 ^g	19
Sprouting for 96 h + autoclaving	ND	100	ND	100	ND	100	2.06 ± 0.01 ^g	23

ND- not detectable.

^{a-n} Means not sharing a common superscript letter with in a column are significantly different ($P < 0.05$).

^a Reduction indicates % decrease over raw value.

^b Increase in sucrose percentage.

2.8 Uso de inductores para incrementar compuestos bioactivos durante el proceso de germinación

Actualmente existe una gran cantidad de información de plantas y vegetales que respalda la importancia de inducir de manera exógena resistencia a diversos factores ambientales (Jahangir y col., 2009) y hacer uso de la inducción con el propósito de incrementar el contenido de compuestos fitoquímicos de interés (Zhao y col., 2005).

Sin embargo es reciente la investigación respecto a la inducción de estos compuestos en etapas tempranas de producción (germinación). Dentro de los germinados principalmente estudiados, se encuentra el de brócoli, por sus importantes componentes bioactivos (Traka y Mithen, 2009). Pérez y col. (2011), reportó que ciertas condiciones de estrés (inducción) ocasionadas a la planta durante la etapa de germinación induce una serie de respuestas

fisiológicas que influyen en el metabolismo primario y secundario de la planta, activando factores de transcripción e induciendo la expresión de genes involucrados en la defensa de la planta, obteniendo germinados de brócoli enriquecidos con compuestos bioactivos.

Estos compuestos parecen tener un importante papel en la prevención de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, (Jeffery y Araya, 2009).

Por otro lado, existen algunos estudios en leguminosas que hacen uso de factores exógenos como son la temperatura, el estrés hídrico y sustancias químicas como el ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, cloruro de sodio entre otros, los cuales incrementan la concentración de compuestos bioactivos (Gharib y Hegazi., 2010; Çavusoglu y Kabar, 2010).

En un estudio realizado por Swieca y col. (2013), se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y calidad nutricional de germinados de *Lentis culinaris* (lenteja), y se observó que la germinación incrementó el contenido de compuestos fenólicos, respecto a la semilla de origen, mientras que el uso de peróxido de hidrógeno mejoro la capacidad para prevenir la peroxidación lipídica del germinado, e incrementó el contenido de componentes nitrogenados lo que se refleja con el decremento de proteína, así mismo se observó una disminución de la biodisponibilidad del almidón disponible y un subsecuente incremento del contenido de almidón resistente

Por otro lado, en un estudio realizado por Limón y col. (2014), se evaluó el efecto de diferentes inductores exógenos; ácido ascórbico, ácido fólico, ácido glutámico, y combinaciones de ácido glutámico y ácido láctico con quitosano sobre la capacidad antioxidante del germinado y su potencial para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) obteniendo un incremento de la capacidad antioxidante y hasta el doble de inhibición de ACE en germinados inducidos con quitosano y ácido glutámico. De esta manera se puede sugerir que la germinación puede incrementar componentes que reducen el estrés

oxidativo y la hipertensión.

Gharib y Hegazi (2010), evaluaron el efecto del ácido salicílico (AS) sobre el estrés por frío durante la germinación de seis variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), observándose que el AS, mejora el proceso de germinación de la semilla estresada en las seis variedades, lo que se refleja en un incremento en los porcentajes y tasa de crecimiento de germinación, así como, en criterios de vigor de la semilla, comparando los tratamientos con semillas bajo condiciones óptimas de crecimiento como control.

2.9 Inducción metabólica generada en respuesta a estímulos exógenos

El proceso de inducción metabólica se caracteriza por una secuencia de eventos moleculares que desencadenan mecanismos de defensa en las plantas. Existe evidencia que demuestra que entre los eventos tempranos ocurridos minutos posteriores al contacto del inductor con la planta, se encuentra la despolarización de membranas y cambios en su permeabilidad, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e incrementos en las concentraciones de calcio (Ca^{2+}) intra y extracelular (Ma y col., 2013).

El proceso de acción inductora se resume en tres etapas. El reconocimiento del inductor por receptores de membrana es la primera etapa de la ruta inductor-transducción. La segunda es la transducción de la señal, una vez que se ha dado la interacción de las moléculas inductoras con sus receptores de membrana, se genera una respuesta compleja en la cual se desencadenan un sin número de eventos que finalmente se reflejan en un incremento transcripcional de genes relacionados con la defensa de las plantas.

Entre los diversos eventos ocurridos en esta etapa se encuentra la desorganización del citoesqueleto celular, la producción de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido y principalmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es un componente clave en la activación transcripcional de genes involucrados en la protección antioxidante de las plantas (Kurosaki,

2012).

Por otro lado, entre la respuesta a los inductores en esta segunda etapa, se encuentra el flujo de iones calcio juega un papel muy importante en las rutas de señalización. En un experimento realizado en un cultivo celular de soya se observó que la presencia de ionóforos de Ca^{2+} induce la síntesis de fitoalexinas, mientras que con bloqueadores de canales de calcio se impidió la inducción de estos metabolitos secundarios. También se ha demostrado que el incremento intracelular de la concentración de calcio está relacionado la activación fosforilativa de AMP Y AMPc, (componentes importantes en las rutas de inducción metabólica) (Ma y col., 2013; Angelova y col., 2006).

La tercera etapa del proceso de inducción es la expresión de la respuesta de defensa de la planta. Esta etapa que pareciera estar diseñada para la protección de la planta a patógenos y factores climáticos incluye respuestas estructurales y bioquímicas. Lo que incluye la producción de componentes estructurales como son celulosa, lignina, glucoproteínas y compuestos fenólicos, fitoalexinas, enzimas de hidrólisis proteica y de carbohidratos complejos entre otros (Benhamou, 1996).

En la Figura 8 se muestran las tres etapas del proceso de inducción metabólica. Se ha reportado el uso de muchas sustancias con potencial inductor, algunos ejemplos son los jasmonatos (metil jasmonato y ácido jasmónico), ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, oligosacáridos como el quitosano, entre otros (García-Mier y col., 2013).

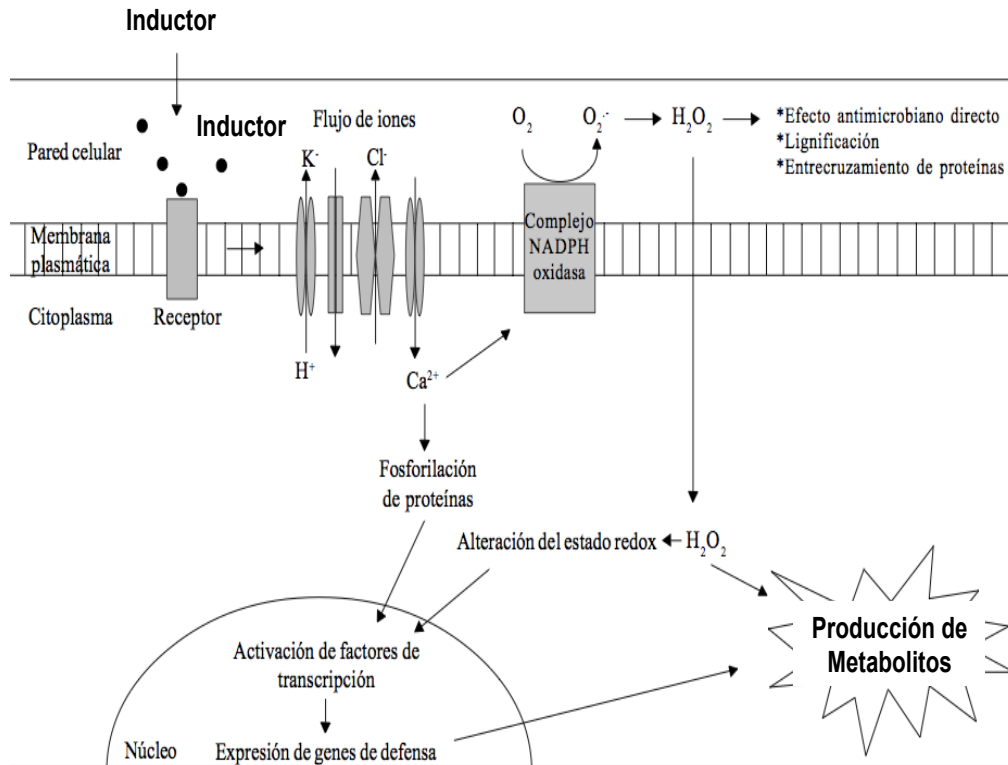


Figura 8. Esquema general de inducción de metabolitos de defensa en plantas.

2.10 Principales rutas metabólicas activadas en respuesta a la inducción.

Las plantas en respuesta a situaciones de estrés sintetizan una diversidad de metabolitos mediante rutas específicas de producción, que se activan de acuerdo al tipo de estímulo que percibe la planta (Bednarek y Osbourn, 2009; Dixon, 2001; Weston, 2003). Los metabolitos producidos de acuerdo a su origen biosintético, se dividen en tres principales grupos, terpenoides, compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides, glucosinolatos y cianohidrinas) y fenilpropanoides también conocidos como compuestos fenólicos. Las rutas biosintéticas del metabolismo secundario activado en respuesta al estrés se derivan principalmente del acetil-CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico y 1-desoxixilulosa-5 fosfato (Croteau y col., 2000; Dewick., 2002) (Figura 9).

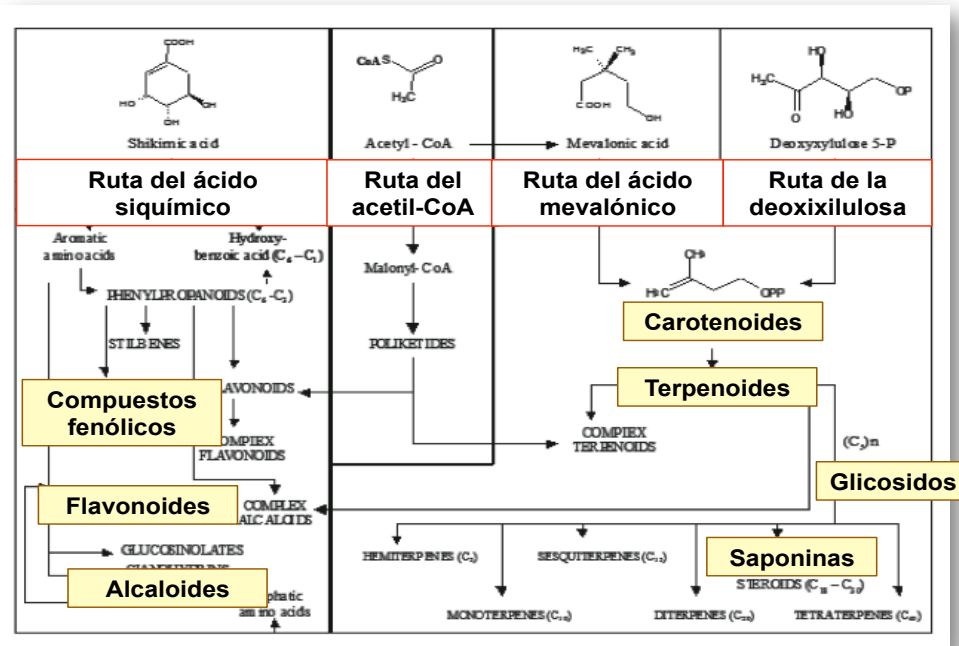


Figura 9. Principales rutas del metabolismo secundario activadas por inducción.

En base a lo anterior, existen suficientes evidencias que demuestran que los inductores podrían incrementar la actividad de las rutas metabólicas relacionadas con la producción de metabolitos secundarios en germinados de frijol, lo cual podría mejorar sus propiedades funcionales.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan una de las principales causas de muerte a nivel mundial y se ha definido a las dislipidemias como uno de los principales factores de riesgo asociado a estas patologías. Por este motivo, se buscan alternativas coadyuvantes para su control y una de estas es la alimentación. Las leguminosas han demostrado tener efectos hipolipidémicos, y sumado a esto, se ha reportado que el contenido nutricional y nutracéutico de leguminosas se incrementa durante el proceso de germinación, mientras que se reducen los factores antinutricios. Además, los germinados presentan un incremento en la digestibilidad de proteínas y carbohidratos complejos.

Por otro lado, la inducción química es una herramienta que se ha empleado para producir estrés químico en las plantas, lo que genera la producción de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos.

Por lo tanto, la combinación de la germinación y la aplicación del estrés abiótico podría incrementar el potencial nutracéutico de los germinados, pero a su vez podría disminuir la producción de compuestos antinutricios.

Debido a lo anterior, el propósito de este estudio es evaluar el efecto de inductores químicos sobre el contenido nutricional y nutracéutico de germinados de frijol, así como determinar sus propiedades hipolipidémicas y posibles mecanismos de acción en un modelo *in vivo*.

IV. HIPOTESIS

El uso de inductores químicos durante la germinación de frijol modifica su metabolismo primario y secundario, mejorando la composición nutracéutica y nutrimental del frijol. La mayor concentración de compuestos fenólicos y otros bioactivos mejorarán las propiedades hipolipidémica de los germinados mediante la inhibición de la absorción intestinal de lípidos, su oxidación y la inhibición de lipogénesis.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno sobre la inducción de compuestos bioactivos en germinados de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y determinar sus propiedades hipolipidémicas.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de tiempo, temperatura y humedad para el proceso de germinación de tres variedades de frijol y seleccionar las variedades para inducir químicamente.
- Evaluar el efecto de ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno sobre parámetros de germinación, componentes antinutricios y nutraceuticos de germinados del frijol seleccionado.
- Determinar el efecto de la inducción química sobre el perfil metabólico de germinados de frijol común.
- Evaluar el efecto hipolipidémico de los germinados en un modelo *in vivo* de dislipidemia.
- Evaluar el efecto del consumo de los germinados sobre mecanismos de acción lipídica.
- Identificar los compuestos asociados a la disminución de lípidos en sangre

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico y componentes químicos

Se trabajó con tres diferentes variedades de frijol; Flor de Junio Dalia, Negro 8025 y Pinto Saltillo, provenientes del INIFAP campus Celaya. Estos materiales fueron donados por el Dr. Jorge Acosta Gallegos.

Se usaron ratas macho Wistar para los experimentos *in vivo*, estas fueron adquiridas en el bioterio de la UNAM, campus Juriquilla.

6.2 Soluciones de inducción

Los inductores fueron disueltos en agua destilada hasta obtener las siguientes concentraciones: quitosano (0.7, 3.3 y 7 μ M), ácido salicílico (0.1, 1 y 2 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM).

6.3 Germinación de las semillas y tratamiento de inducción en los germinados.

6.3.1 Implementación de las condiciones de germinación

La germinación se llevó a cabo tomando en cuenta el método de Limón y col. (2014). Primeramente 50 g de cada una de las tres variedades de frijol fue sumergida en una solución de hipoclorito de sodio (1.5%) en relación 1:6 peso-volumen durante 30 min a temperatura ambiente. Después, las semillas fueron drenadas y lavadas con agua destilada hasta que el agua de lavado presentó un pH neutro. Posteriormente, se sumergieron en agua destilada (1:6 p/v) por 5.5 h, y durante este tiempo fueron agitadas cada 30 min.

Posteriormente las semillas hidratadas fueron colocadas en charolas de germinación donde se cubrieron con papel filtro humedecido y se colocaron dentro de una cámara de germinación previamente esterilizada. En esta etapa, se evaluaron dos temperaturas de germinación (20 y 25 °C), dos humedades relativas (60 y 78 % HR). La germinación se llevó a cabo en oscuridad de 1 a 5

días. Durante este periodo, el papel filtro fue humedecido diariamente con agua destilada y se midió diariamente porcentaje de germinación, cantidad de agua absorbida y tamaño de radícula.

6.3.2 Inducción química de germinados.

Una vez que fueron implementadas las condiciones de germinación con las tres variedades de frijol, se seleccionó a la variedad que presento mejores características agronómicas para en ésta llevar a cabo el proceso de inducción química.

Se usaron ácido salicílico (0.1, 1 y 2 mM), quitosano (0.7, 3.3 y 7 μ M) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM) como soluciones de inducción. Durante el periodo de germinación, el papel filtro fue humedecido diariamente con las soluciones de inducción. Se incluyó también un control negativo de semillas germinadas en agua destilada. Cada experimento de germinación se llevó a cabo por triplicado y se midieron diariamente porcentaje de germinación, y tamaño de radícula.

Al final del proceso, los germinados fueron secados por convección a 60 °C durante 24 h, pulverizados y almacenados a – 20 °C, hasta el momento de sus análisis químico.

6.3.3 Porcentaje de germinación, longitud radicular y porcentaje de absorción de agua

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

$$\% \text{ germinación} = ((\text{número de semillas germinadas}) / (\text{número total de semillas})) \times 100$$

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 un vernier

desde el cuello del vástago hasta el meristema apical (Figura 10).

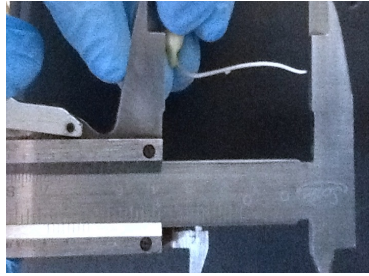


Figura 10. Medición de variable de longitud radicular

El porcentaje de absorción de agua se expresa entre el peso fresco del total de las semillas respecto al peso que adquieren las semillas durante el proceso de germinación por cien.

$$\% \text{ absorción de agua} = ((\text{peso inicial de las semillas}) / (\text{peso final})) \times 100$$

6.4 Análisis nutricional de los germinados

Se llevó a cabo el análisis nutricional de las harinas de los germinados inducidos por los métodos de la AOAC (Latimer, 2012), teniendo como controles la semilla cruda y el germinado con agua destilada.

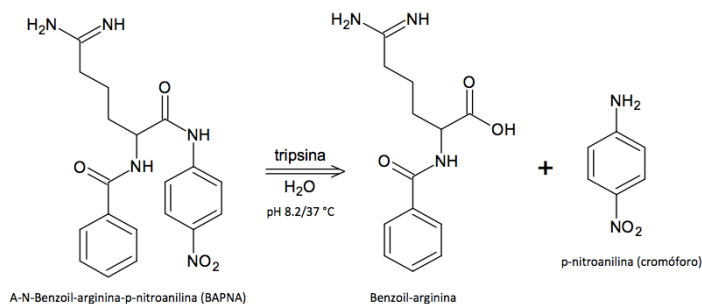
6.5 Determinación de los componentes antinutricios de los germinados

6.5.1 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 col. (1974) con modificaciones de Vidal-Valverde y col. (2002).

El extracto directo o diluido se mezcló con una solución estandarizada de tripsina (40 µg/10 mL), y después de un cierto tiempo se determinó la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produjo una coloración que se leyó 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 adicionó 50 mL de NaOH 0.01N ajustando el pH a 8.2 y manteniendo en agitación por 3 h. Posteriormente, se filtró. 250 μ L del filtrado fueron incubados con 250 μ L de una solución de tripsina (0.04% en buffer de HCl-Glicina 0.001M) diluida con 1 mL de buffer Tris (pH 8.2). Posteriormente, se le agregaron 2.5 mL de BAPNA previamente incubado a 37 °C. Finalmente, se midió la absorbancia a 410 nm. Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakade y col. (1974). La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.), por lo cual finalmente los resultados se expresaran como unidades inhibitorias de tripsina por mg de muestra seca.

6.5.2 Cuantificación de ácido fítico

El 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 FeCl₃/ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe(III) con el ácido fítico.

Se pesó 1 g del germinado y se le adicionó 20 mL de HCl 2.4% (0.65N) ajustando el pH a 1, e incubó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. El extracto obtenido se centrifugó a 12 000 rpm por 30 min a temperatura ambiente y se obtuvo el sobrenadante. Posteriormente, se realizó un proceso de purificación del ácido fítico usando una columna de intercambio iónico (0.7 x 15 cm) empacada con resina de intercambio iónico (AG 1-X4, 100-200 dry mesh Bio-Rad). Para este paso de la purificación se usaron 10 mL del extracto diluido en una relación 1:25 (pH 6), la elución se llevó a cabo usando 15 mL de NaCl 0.7 M (pH 3). Para la cuantificación del ácido fítico total, 3 mL de la solución eluida, que contiene el ácido fítico purificado, fueron mezclados con 1 mL de reactivo Wade ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 3%), posteriormente la mezcla se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm. Finalmente la absorbancia fue medida a 500 nm. El contenido de ácido fítico se estimó usando una curva estándar de calibración de ácido fítico (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). El resultado fue expresado como mg de ácido fítico por g de muestra seca.

6.5.3. Determinación de lectinas mediante hemaglutinación de eritrocitos

La determinación de lectinas se realizó mediante la técnica de actividad hemaglutinante de acuerdo al método previamente reportado por Grant y col. (1983). En placas de microtitulación se colocaron 25 μL 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 leyó 2 h después a temperatura ambiente utilizando un estereoscopio y se reportó como unidades de hemaglutinación por mg de proteína.

6.5.4. Determinación de inhibidores de alfa amilasa

La actividad inhibitoria de alfa amilasa (AIA) fue evaluada de acuerdo al método descrito por Deshpande y col. (1982). Un gramo de harina del germinado fue

mezclado con 10 mL de solución salina 0.1 M por 12 h a 5 °C. Posteriormente la mezcla fue filtrada y 0.25 mL del extracto se incubaron con 0.25 mL de una solución de alfa amilasa (0.003 % en buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7 y NaCl 0.006 M) durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 0.5 mL de una solución de almidón al 1% previamente calentada a 37 °C. Después de 10 min la reacción fue detenida adicionando 2 mL de DNS (ácido dinitrosalicílico) y calentando a ebullición en baño maría durante 10 min. Finalmente la absorbancia fue medida 540 nm. Una unidad de actividad amilolítica fue definida como los mg de proteína requeridos para hidrolizar 0.06 mg de almidón por minuto. El método de Bradford fue usado para determinar la proteína de los extractos.

6.6 Análisis nutracéutico de los germinados

6.6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

Para la extracción de compuestos fenólicos se usaron 0.5 g de la harina de germinado, a la cual se le adicionaron 20 mL de una solución metanol-agua (50:50 v/v; pH 2), la mezcla fue agitada por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada a 4000 g por 10 min. El sobrenadante y residuo fueron recuperados por separado. 20 mL de una solución acetona-agua (70:30 v/v) se adicionó al residuo. La mezcla se agitó durante 1 h y se centrifugó como se describió anteriormente. Los extractos metanol-agua y acetona-agua fueron mezclados y usados para la cuantificación de compuestos fenólicos totales por la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1998) y los flavonoides totales fueron cuantificados por el método de Heimler y col. (2006). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra y mg equivalentes de catequina por gramo de muestra, respectivamente.

6.6.2 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos se realizó de acuerdo al ensayo de la vainillina, de Deshpande y Cheryan (1987) adaptado para el uso en microplaca. Para esta

determinación, por separado se pesaron 1 g de cada harina y sus controles. Se adicionaron 10 mL de metanol, se agitó durante 24 h a 24 °C, y la muestra se centrifugó, del sobrenadante se tomaron 10 µL y se les adicionaron 200 µL de reactivo vanillina al 0.5 % (vanillina 1 % y HCl 8% en proporción 1:1). La concentración de compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de (+) catequina, y la concentración se expresó como mg equivalentes de (+) catequina por g de muestra.

6.6.3 Cuantificación de saponinas totales

Para la cuantificación de saponinas, a un gramo de muestra, se le adicionaron 10 mL de metanol al 80 % bajo reflujo. Posteriormente el metanol fue removido por rota-evaporación en condiciones de vacío. El extracto resultante, fue suspendido en un 1 mL de agua destilada. Una alícuota de 200 µL de acetona se adicionó a la mezcla, la cual fue centrifugada a 2500 g durante 15 min. Los sobrenadantes fueron recuperados. Finalmente la concentración de saponinas fue cuantificada por el método de Dini y col. (2009). Cuidadosamente, 0.1 mL del extracto fueron incubados con 1 mL de ácido sulfúrico al 72 % y 0.8 % de vainillina en etanol. La mezcla se incubó en baño maría a 60 °C durante 20 min. Posteriormente se enfrió con baño de hielo. Finalmente las absorbancias fueron medidas a 544 nm y la concentración de saponinas totales se estimó usando el coeficiente de extinción molar de soyasaponina B.

6.7 Perfil de compuestos fitoquímicos mediante el análisis UPLC-ESI-MS/MS y HPLC-ESI-MS

Harinas de los germinados (0.25 g) fueron mezclados con 0.5 mL de acetona-agua (70:30), y fueron sonicados tres veces por 30 segundos, reposando 15 segundos entre cada sonicación. Las muestras fueron centrifugadas a 25 000 g por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado, y el proceso de extracción fue repetido con el residuo. Finalmente ambos sobrenadantes fueron mezclados y filtrados. Posteriormente fueron inyectados en el sistema UPLC-

ESI-MS/MS system.

El perfil de compuestos fenólicos fue analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución (UPLC), acoplado un espectrómetro de masas (ESI-MS/MS) usando un equipo Xevo-TQS (Waters Co, Milford, USA). Para la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos, 5 μ L del extracto fueron inyectados en una columna Acquity BEH C8 (1 100 mm, 1.7 μ m) a 30 °C. El sistema binario de solvents (velocidad de flujo de 250 μ L por min), consistió del solvente A (ácido fórmico-agua 75 mM) y el solvente B (acetonitrilo). El gradiente inicial fue 5% B, y se mantuvo por 0.8 min, incrementando a 10% B de 0.8 a 1.2 min y se mantuvo hasta 1.9 min, posteriormente se incrementó a 15% B desde 1.9 a 2.4, se sostuvo hasta 3.7 min, posteriormente aumentó a 21% B desde 3.7 hasta 4.0 min y retenido hasta 5.2 min. Posteriormente, se incrementó a 27% B de 5.2 a 5.7 min, para después subirlo a 50% B desde 5.7 a 8 min, y entonces se incrementó a 100% B de 8 a 9 min. Finalmente, las condiciones fueron regresadas a 5% B de 9 a 11.5 min and se mantuvieron constantes por 0.5 min. La temperatura de la muestra fue de 20 °C (modificado de Gruz, y col., 2008).

Para la cuantificación de los flavonoides, 5 μ L del extracto fueron inyectados a la columna antes mencionada a 40 °C. El solvente binario fue inyectado con una velocidad de flujo de 400 μ L por min, y consistió de solvente A (ácido fórmico-agua 1%) y solvente B (metanol). El gradiente inicial fue % de B, el cual incremento a 32 % desde 0 a 2.5 minutos. Posteriormente el gradiente de B se incrementó hasta 45 % desde los 2.5 min hasta 4.8 min. Posteriormente se volvió a incrementar hasta 55 % de los 4.8 a las 5.6 minutos, manteniéndose en este gradiente hasta cumplir 7.6 min. Se llevó a cabo otro incremento de B hasta 95 % manteniéndose así desde los 7.6 min hasta los 9.5 min. La temperatura de la muestra fue de 25 °C.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes. La temperatura de la fuente fue 150 °C. Se usó nitrógeno como gas de desolvatación (800 L por h) a 500 °C. Los voltajes del cono y capilar fueron 50 V

y 1.5 kV, respectivamente. La identificación se realizó usando un esquema múltiple de monitoreo (MRM) en modo (ES-). La cuantificación se realizó usando estándares de ácidos fenólicos y flavonoides. Los resultados fueron expresados como μg del compuesto por g de muestra.

Para la cuantificación de saponinas, se realizó la extracción de la siguiente manera. 25 mg de muestra seca fue mezclada con 500 μL de metanol:agua 80:20 (v/v) como se describe previamente para la extracción de polifenoles. Los solventes fueron evaporados a vacío a 30 °C. Las muestras fueron disueltas en 100 μL de la fase móvil e inmediatamente inyectadas al sistema de cromatografía.

Las muestras fueron inyectadas a un sistema Agilent 1200 HPLC-DAD conectado a un SL quadrupole mass spectrometer Agilent 1100, y equipado con una interface de electrospray. 20 μL del extracto se inyectó a una columna de fase reversa (Zorbax ODS-C18, 150 mm 4.6 mm, 5 μm) a 35 °C. El sistema binario de solventes fue inyectado a un flujo de 400 μL por minuto y consistió del un solvente A (agua-acetato de amonio 8mM) y solvente B (acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico). El gradiente inicial fue el solvente B al 20%, el cual se incrementó a 25 % durante 3 min. Posteriormente incrementó nuevamente a 50 % durante 17 min. Nuevamente se aumentó hasta 80 % durante 10 min. Finalmente la columna fue reequilibrada con la condición inicial por 5 min. El tiempo total de corrida fue de 35 min. La temperatura de la muestra fue de 4 °C.

El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo (ESI-), usando las siguientes condiciones. Voltaje del capilar 4000 V, presión del nebulizador, 40 psi, velocidad del gas de pesado 10 L/min, temperatura del gas, 300 °C. (modified from Zhang y col., 2015). La cuantificación fue realizada usando el estándar comercial soyasaponina I.

6.8 Determinación de la capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH

La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología ABTS^{•+} (2,2'azinobis-(3 etilbensotiazolin-6-ácido sulfónico) (7 mM), desarrollada por Re y col. (1999) donde se generó primero al radical ABTS por medio de una reacción de oxidación, en una solución de per-sulfato de potasio (12 h antes de ser usado) y posteriormente se evaluó la capacidad a ser neutralizado con los germinados.

Una vez formado el radical, este se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.76 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorbancia).

Posteriormente se colocaron 980 μ L del radical ABTS y se mezclaron con 20 μ L de los extractos de los germinados con el fin de evaluar la concentración inhibitoria porcentual. La mezcla se dejó reposar por 7 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Posteriormente se leyó la absorbancia a 754 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la formación del radical.

Adicionalmente, se determinó la capacidad antioxidante por el método DPPH[•] desarrollado por Brand y col. (1995), basado en la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical DPPH[•].

Para lo cual, se preparó una solución 0.1 mM de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en metanol, posteriormente, 1 mL de esta solución se adicionó a los extractos. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, se determinó la absorbancia de la mezcla a 517 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la formación del radical DPPH[•].

6.9 Determinación de las propiedades hipolipidémicas de los germinados de frijol en un modelo *in vivo*.

La inducción de dislipidemia en las ratas macho de la cepa Wistar se realizó mediante el consumo de una dieta rica en grasa, fructosa, de acuerdo al método Russel y col. (2006).

La variedad de frijol que fue evaluada en el experimento, se determinó en base a los resultados de las determinaciones químicas de los germinados. La cual fue el frijol Flor de Junio Dalia.

Los animales se dividieron en siete grupos de ocho ratas cada uno. El primer grupo fue un grupo control sano alimentado con una dieta normal (croquetas de Alimento nu3lab 22-5, con un 22% de proteína, 5% de grasa y 6% de fibra), el segundo grupo, fue el grupo control dislipidémico (obesas) alimentado con la dieta rica en grasa y fructosa, los cinco siguientes grupos fueron los grupos tratamiento, todos con la dieta dislipidémica suplementada (10 %) con su respectivo germinado (germinado sin inducir y cuatro de los germinados inducidos seleccionados anteriormente). A todos los grupos, se les suministró agua potable *ad libitum*.

El experimento se llevó a cabo durante 3 meses. Durante el experimento se midió la cantidad de alimento consumido, así como el peso corporal. Al final del experimento las ratas fueron anestesiadas con éter, para obtener las muestras de sangre por punción cardiaca. Se determinaron, glucosa (GLU), triglicéridos (TG), colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero mediante kits enzimáticos de la marca SPINREACT.

Por otro lado también se obtuvieron muestras de hígado, tejido adiposo y heces. Se determinaron triglicéridos en hígado, tejido adiposo y heces usando un Kit Triglyceride Assay, y se evaluó la integridad de todos los órganos extraídos mediante estudios de histología.

6.10 Evaluación de los mecanismos de acción lipídica de los germinados

6.10.1 Inhibición de la lipasa pancreática en la absorción de lípidos

La inhibición de la lipasa pancreática se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por (Gilham y Lehner, 2005). La lipasa de páncreas porcino, tipo II (Sigma product L3126), se disolvió en agua destilada a una concentración de 10 mg/mL. El amortiguador que se usó fue Tris 100 mM (pH 8.2). El sustrato usado fue para-nitrofenil laurato (pNP laurate), el cual se disolvió en acetato de sodio 5 mM (pH 5) que contenía 1% de Tritón X-100. Para preparar la muestra, un gramo de la misma se diluyó con 1 mL de agua, se agitó durante 1 min con vortex y posteriormente se centrifugó a 5000 g durante 5 min a 4 °C. El control del ensayo contenía, 400 µL del amortiguador de ensayo, 450 µL de la solución sustrato, 150 µL de la solución de la enzima y 50 µL de agua. Los ensayos con las muestras contenían 50 µL del extracto de los mismos en lugar del agua. Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C por 2 h y posteriormente fueron centrifugadas a 16 000 g por 2.5 min. Finalmente la absorbancia del sobrenadante se midió a 400 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS. Todas las muestras se ensayaron por triplicado teniendo un blanco de inhibición para cada una de ellas. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la enzima.

6.10.2 Análisis de simulación docking de la inhibición de la lipasa con compuestos cuantificados mediante HPLC.

El acoplamiento molecular se realizó entre la lipasa de *Rattus norvegicus* [SWISS-PROT: proteína relacionada con la lipasa pancreática (LIPR2_RAT P54318)] y los fitoquímicos con efecto anti-lipasa más relevantes de los germinados inducidos químicamente. Los ligandos evaluados fueron (PubChem CID): ácido protocatecuico (72), ácido 4-hidroxibenzoico (135), rutina (5280805), hesperidina (10621), soyasaponina I (12209) y campesterol glucósido (70699334). Las estructuras del ligando se extrajeron primero (3D) en ChemSketch v.11.02 y se convirtieron en un formato de acoplamiento (.pdb). El

ajuste de los ángulos/torsión de cada ligando se llevó a cabo en el software Avogadro v2.0 (Hanwel y col., 2012) y se exploró su estructura molecular con la enzima (como plantilla rígida) en el software UCSF quimera v1.11. La optimización del ligando (orientación molecular preferida) con la menor energía de unión (ΔG_{bind}) se registró para cada ligando. Las interacciones moleculares de los dos inhibidores más plausibles se analizaron considerando aspectos tales como las distancias entre los átomos (Å), sus orientaciones y la electronegatividad.

Las propiedades moleculares y el drug-likeness de cada ligando (secuencia SMILES) se evaluaron mediante quimio-informática. Las propiedades moleculares [Coeficiente de partición de octanol-agua (MiLogP), área de superficie polar topológica (TPSA, Å), peso molecular (MW, g / mol), donante de enlaces de hidrógeno (HBDC, #)/aceptor (HBAC, #) recuento, rotable Recuento de enlaces (RBC, H) y número de violaciones de de Lipinski (LPV, #) "regla de cinco"] y puntuaciones de bioactividad [ligando del receptor acoplado a proteína G (1), modulador de canales iónicos (2), inhibidor de quinasas (3) , el ligando del receptor nuclear (4), la proteasa (5) y el inhibidor de la enzima (6)] se calcularon utilizando el kit de herramientas © Molinspiration WEB (<http://www.molinspiration.com>).

6.10.3 Análisis lipidómico por ULPC/MS/MS de hígados de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa

Para el estudio de lipidómica a 100 mg de hígado se le adicionaron 100 μ L de cloruro de sodio 0.15 M y 400 μ L de cloroformo-metanol (2:1). Posteriormente la mezcla se homogenizó y centrifugó a 13, 000 g por 5 min a 4 °C. Después se recuperó la fase inferior, la cual fue concentrada y re-suspendida en 50 μ L de acetonitrilo, que finalmente se colocó en un vial para inyección.

Las muestras fueron analizadas en un sistema de Cromatografía de Líquidos de Ultra-Resolución (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas de triple

cuadrupolo (QqQ MS) con una interfase de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) (ACQUITY XEVO-TQS) (Waters Corp, Milford, MA). El extracto lipídico (2 µL) fue inyectado a una columna ACQUITY UPLC HSS C18 SB de 1.8 µm (2.1 x 100 mm), la cual fue mantenida a 50 °C. La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min. Los solventes utilizados fueron agua-ácido fórmico (99.9:0.01) con 10 mM de acetato de amonio al cual se le nombró fase A, y acetonitrilo-ácido fórmico con 10 mM de acetato de amonio, al cual se le nombró fase B. Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 0-1 min 85% A/15% B, 1-2 min incremento lineal a 45% A/55% B, 2-3 min 45% A/55% B, 3-9 min incremento lineal a 0% A/100% B; 9-10 min 0% A/100% B. Finalmente se realizó un re-equilibrio de la columna a 85% A/15% B durante 3 min, con un tiempo total de corrida de 13 min.

El espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización positivo (APCI+) y negativo (APCI-). Se realizó el Monitoreo de Reacciones múltiples (MRM) de cada lípido durante toda la corrida (0-13 min), así como un escaneo en el rango de masas de 250-1100 Da. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: temperatura de fuente y de desolvatación de 150 y 300 °C, respectivamente; se utilizó nitrógeno como gas de desolvatación y de cono a un flujo de 250 y 150 L/h, respectivamente; se utilizó argón como gas de colisión a un flujo de 0.13 mL/min. El voltaje del cono fue de 39 V, mientras que el voltaje capilar fue de 2.6 kV en modo positivo y 1.5 kV en modo negativo. La energía de colisión en modo MS fue de 2 y en modo MS/MS de 20. Los datos fueron procesados en el software MassLinx v 4.1.

6.10.4 Cuantificación de la expresión de genes de lipogénesis y beta oxidación en hígado.

Para la cuantificación de los genes primero se llevó a cabo la extracción de ácido ribonucleico (ARN) de cada una de las muestras de hígado extraídas de las ratas. La extracción se realizó mediante la técnica del trisol, comprobando la calidad del mismo mediante el uso de un nanodrop. Posteriormente, el ARN fue

utilizado para la formación del ácido desoxi ribonucleico complementario usando fragmentos específicos. Una vez que se tuvieron las cadenas del ADN complementario (ADNc), se cuantificó y corroboró su calidad con el uso nuevamente del nanodrop. El ADNc fue usado para realizar los ensayos de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para cuantificar la expresión de los genes relacionados con lipogénesis SRBP y ACC, así como los genes relacionados con beta-oxidación, CPT-I y ACAD.

6.11 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar (DE). La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, además se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) usando el programa JMP 13.0 PRO (demo), con la finalidad de identificar posibles asociaciones entre los efectos de los diferentes tratamientos con los metabolitos cuantificados previamente en los germinados mediante HPLC.

El análisis de los datos de los lípidos identificados se llevó a cabo utilizando análisis multivariable. Primeramente, los datos fueron transformados a log₁₀ y posteriormente se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP). El gráfico de puntuaciones obtenido del ACP se utilizó para visualizar la estructura general del conjunto de datos y con ello las posibles agrupaciones basadas en las intensidades de los lípidos, así como para identificar anomalías basadas en los principios de Hotelling (T²) en ellos. Adicionalmente, a través del gráfico de cargas factoriales, se determinaron los coeficientes de correlación, de cada lípido dentro de los componentes identificados, y aquellos con los valores más altos fueron seleccionados.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Implementación de las condiciones del proceso de germinación de frijol común.

La primera etapa del trabajo experimental consistió en implementar las condiciones de germinación para las tres variedades, se llevaron a cabo pruebas en una cámara bajo condiciones controladas: dos temperaturas (20 y 25 °C) y dos humedades relativas (60 y 78 % HR), en oscuridad, durante 5 días. Los parámetros de germinación que se evaluaron fueron el porcentaje de semillas germinadas, el tamaño de radícula y la cantidad de agua absorbida.

La germinación se inicia con la imbibición y termina con la emergencia. La imbibición es el proceso de absorción de agua por la semilla, que se da por la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y la solución de imbibición. En la Figura 11 se muestra el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la absorción de agua de las tres variedades en estudio. Se inició con 100 g de cada una de las semillas, se puede observar que a través del tiempo, para todas las condiciones, las semillas de las tres variedades absorben agua. Adicionalmente se observa que las tres variedades alcanzaron aproximadamente el doble de su peso en las condiciones de temperatura y humedad relativa de 25 °C y 78 %HR respectivamente, siendo la variedad Flor de junio Dalia la que absorbió mayor cantidad de agua.

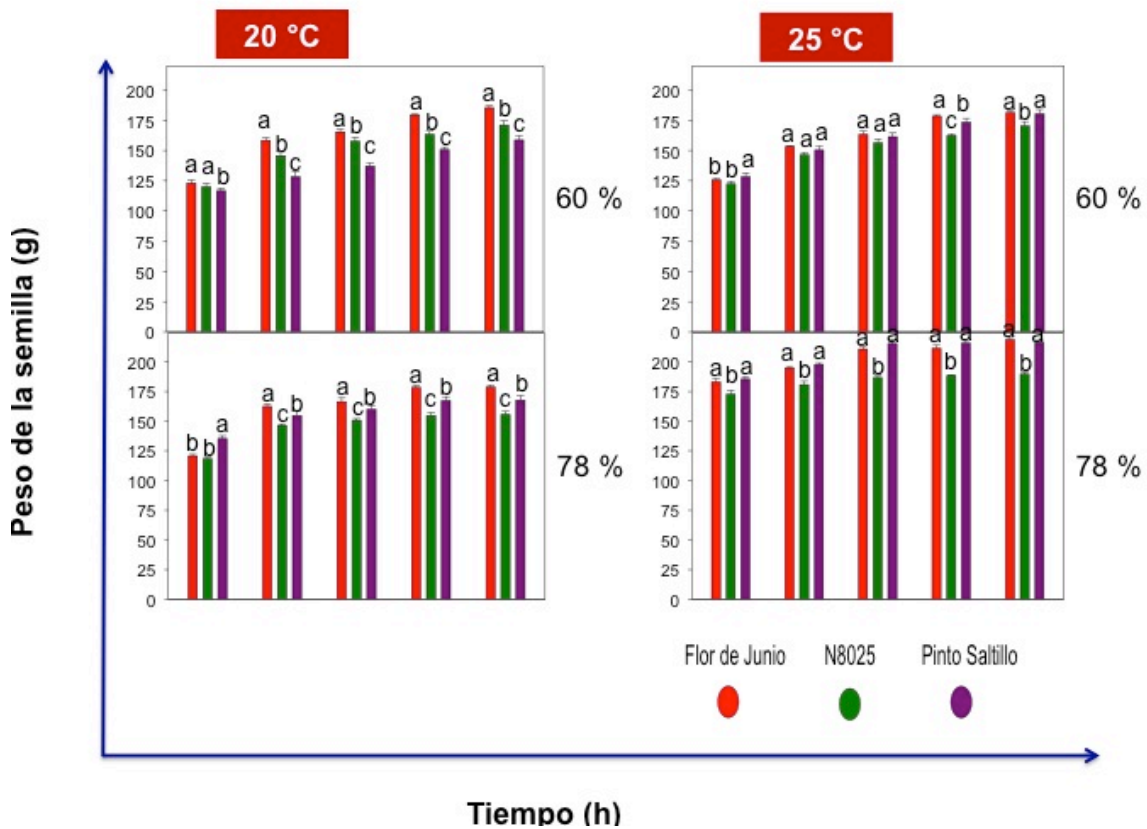


Figura 11. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el proceso de imbibición de las variedades de frijol. Los datos se expresan como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

La absorción de agua durante la germinación está directamente influenciada por la presencia y la permeabilidad de la testa, así como la humedad y la temperatura ambiental. En este sentido se observó, que las variedades con mejor permeabilidad de agua fueron pinto saltillo y Flor de Junio Dalia, y que este efecto se ve mejorado con la temperatura, lo cual sugiere que la testa de esta variedades es más suave.

Por otro lado, el vigor de la semilla es su capacidad de emerger, sobrevivir bajo condiciones potencialmente estresantes y crecer rápidamente bajo condiciones favorables. Una disminución en el vigor de la semilla y otros cambios fisiológicos ocurren antes de la pérdida de germinación. Por lo tanto, una semilla con germinación aceptable puede ser baja en vigor. Es por lo anterior que, para complementar la información que genera el porcentaje de germinación, se tomó en cuenta el tamaño de radícula que es un parámetro de

vigor el cual representa la capacidad que tienen la semilla a emerger en el proceso germinativo.

En la Figura 12 se puede observar que la temperatura y la humedad relativa afectan el desarrollo radicular durante la germinación, siendo la temperatura de 25 °C y 78 %HR las condiciones en las que se presentaron los tamaños de radícula mayores a los 30 mm desde el tercer día, y la variedad Flor de junio Dalia la que alcanzó tamaños de radícula mayores a 50 mm respecto a las otras dos variedades en los 5 días del proceso germinativo bajo estas mismas condiciones de humedad y temperatura.

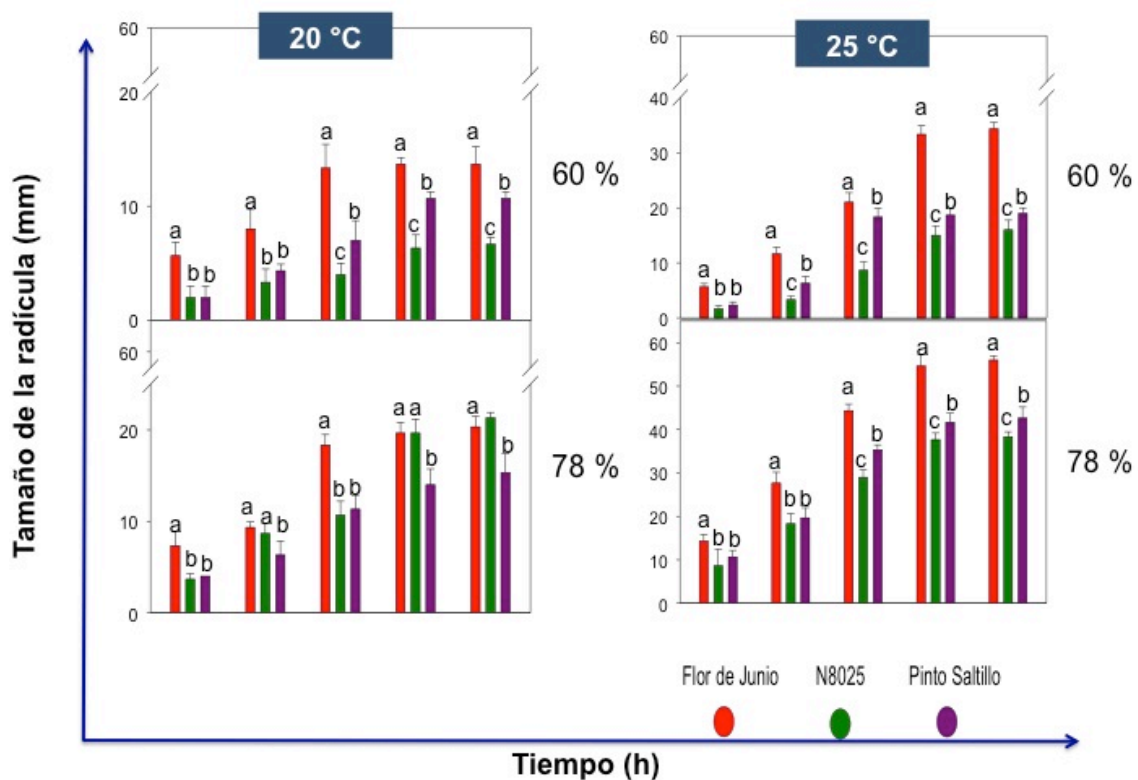


Figura 12. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el tamaño radicular. Los datos se expresan como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Adicionalmente, la germinación se define como el surgimiento y desarrollo de las estructuras esenciales a partir del embrión, que indican la capacidad de la semilla para producir una planta normal en condiciones favorables. La germinación se expresa como el porcentaje de semillas que germinan en

relación al total de semillas.

En la Figura 13 se muestra la germinación bajo las dos condiciones de temperatura y HR antes mencionados. Se puede observar que la temperatura que permite mayores porcentajes de germinación es la de 25 °C a 78 % HR, logrando bajo estas condiciones porcentajes de germinación superiores al 50% en las primeras 24 h, lo cual es un indicativo de calidad en el proceso. Si bien la HR influyó en la germinación, la temperatura es el factor de mayor impacto en el porcentaje de germinación, siendo mayor a 25 °C. Observándose que a mayor temperatura mayor porcentaje de germinación, y la variedad Flor de junio Dalia fue la que presentó el mayor porcentaje de germinación respecto a las otras dos variedades.

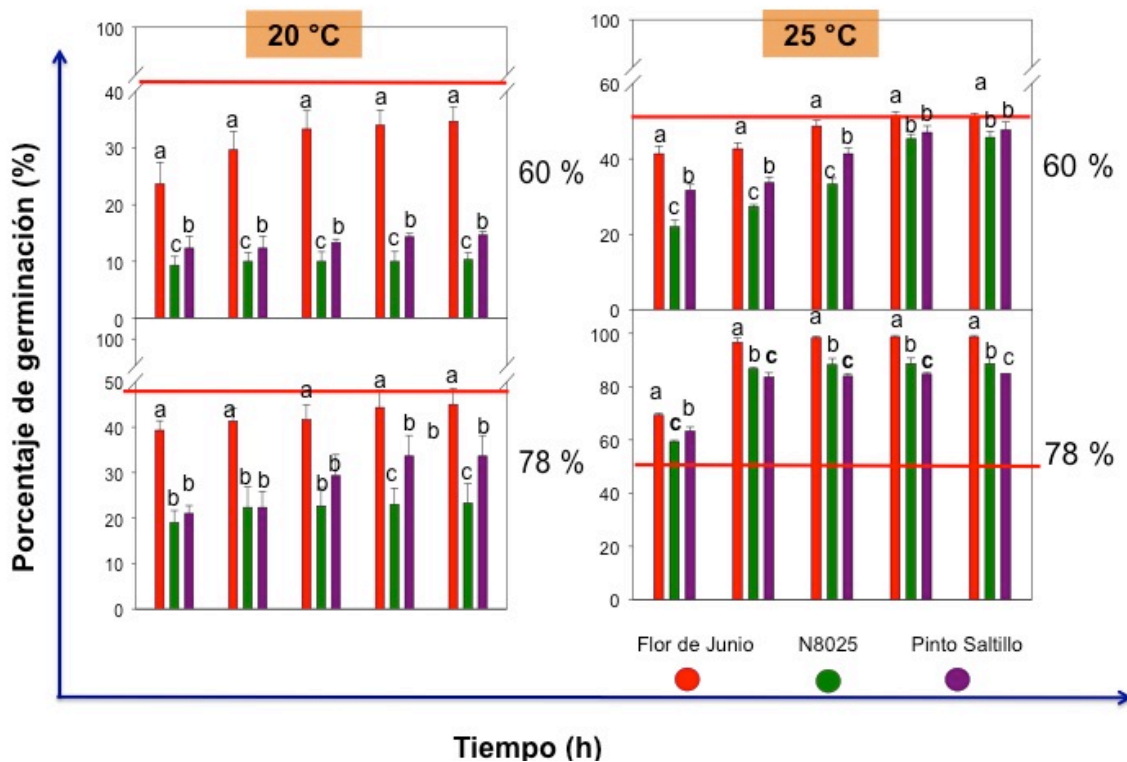


Figura 13. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el porcentaje de germinación. Los datos se expresan como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, se determinó que la variedad Flor de Junio Dalia sería sometida a la siguiente etapa del

experimento que fue la inducción química de metabolitos y que las condiciones de germinación adecuadas para este propósito serían 5 días de germinación, con humedad relativa de 78 % y temperatura de 25 °C.

7.2 Efecto de la Inducción química sobre el porcentaje de germinación y tamaño de radícula en la variedad Flor de Junio Dalia

El uso de inductores químicos en las plantas ha sido usado recientemente para incrementar la disponibilidad de nutrientes en el proceso de germinación y esta nueva tecnología ha dado buenos resultados, observándose un incremento en la emergencia, vigor y mayor desarrollo en la parte aérea y en las raíces (Habibi y Abdoli, 2013).

Para esta parte del trabajo experimental se llevó a cabo la inducción química con quitosano (0.7, 3.3 y 7 μ M), ácido salicílico (0.1, 1 y 2 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM).

En la Figura 14 se puede observar que la aplicación de los inductores químicos aceleró la producción de plántula, observándose al quinto día la aparición de las primeras hojas. Este proceso podría deberse a que estas sustancias actúan mediante la inducción de moléculas de crecimiento en el germinado como las auxinas y las giberelinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad y longitud de las raíces de los vegetales (Habibi y Abdoli, 2013). Por otro lado, se ha reportado que pueden actuar directamente como moléculas señal de crecimiento, puesto que el ácido salicílico y peróxido de hidrógeno son moléculas que están presentes de manera natural en la planta, y al ser aplicadas de manera exógena y ser absorbidas por la semilla en el agua de imbibición son reconocidas como moléculas mensajeras del proceso de crecimiento (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011; Çavusoglu y Kabar, 2010).

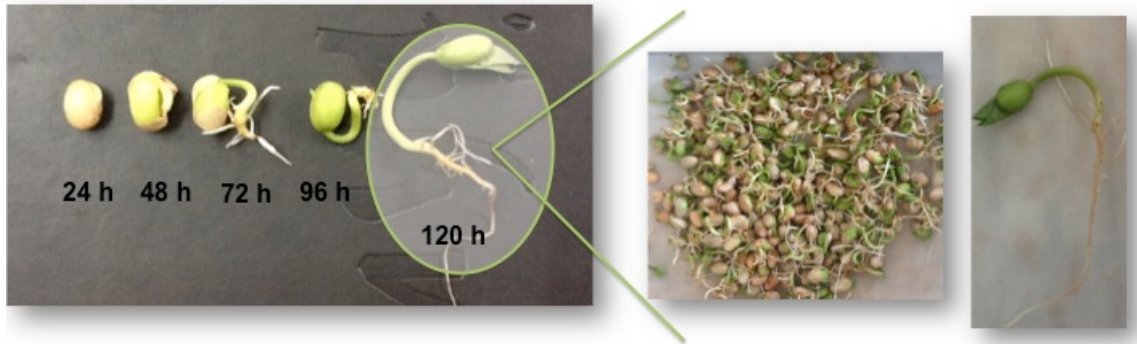


Figura 14. Efecto de las sustancias químicas de inducción sobre la producción adelantada de plántula en Flor de junio Dalia.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, para la etapa de inducción química, el proceso de germinación se acortó a tres días.

Para analizar el efecto de los inductores químicos durante la germinación sobre las variables evaluadas, porcentaje de germinación y tamaño de radícula, se estimaron dos modelos logísticos de tres y dos parámetros.

Para el porcentaje de germinación el modelo logístico fue; $y = \frac{\theta_1}{1 + \theta_1 \cdot \exp(-\theta_2(t - \theta_3))}$, donde θ_1 es la asíntota de "y". θ_2 representa la tasa de crecimiento a la cual ocurre la germinación ("y"), y θ_3 , representa el punto de inflexión, el cual puede ser interpretado como el tiempo en el cual "y" alcanza la mitad del valor asíntótico. En el Cuadro 8, se pueden observar los valores de los tres parámetros del modelo logístico para el porcentaje de germinación y en la Figura 15 se muestra su comportamiento gráfico.

Los resultados de la cinética del porcentaje de germinación, mostraron que el control germina más rápido (tasa de crecimiento de 5.6) que los tratamientos con estrés químico (tasa de crecimiento entre 1.2-2.1). Sin embargo, las concentraciones más bajas de cada inductor químico tienen valores similares de asíntota (85.2-93.3 %) comparadas con el control (85.7 %). Estos resultados indican que el estrés químico decrece la tasa de germinación del frijol Flor de Junio Dalia. Sin embargo, al tercer día de proceso, la mayoría de los tratamientos (Q 0.7 μ M, AS 0.1 mM y 1 mM, y H₂O₂ 10 mM) no afectan significativamente el porcentaje de germinación y algunos tratamientos presentaron similar o incluso mayores porcentajes de germinación (0.5–0.6

días), respecto al control indicado por el punto de inflexión (0.9 días).

Cuadro 8. Parámetros matemáticos de los modelos logísticos del porcentaje de germinación y tamaño de radícula.

Tratamiento	Porcentaje de germinación			Tamaño de radícula	
	Tasa de crecimiento θ_2	Punto de inflexión θ_3	Asíntota θ_1	Escala logarítmica a	Tasa de crecimiento b
Control	5.6 ± 0.1	0.9 ± 0.01	85.7 ± 0.1	4.0 ± 0.1a	0.9 ± 0.01a
Q 0.7 µM	2.1 ± 0.2ab	0.6 ± 0.01d	88.1 ± 0.1abc	4.1 ± 0.1a	0.9 ± 0.02a
Q 3.3 µM	1.1 ± 0.1d	1.3 ± 0.01a	90.0 ± 0.2a	3.4 ± 0.2a	0.9 ± 0.01a
Q 7 µM	1.8 ± 0.2ab	1.1 ± 0.02ab	68.6 ± 0.1d	3.4 ± 0.1a	0.9 ± 0.01a
AS 0.1 mM	1.7 ± 0.2ab	0.6 ± 0.01d	85.2 ± 0.1abc	3.4 ± 0.1a	1.0 ± 0.01a
AS 1 mM	1.2 ± 0.1cd	0.6 ± 0.01d	93.3 ± 0.2a	3.5 ± 0.1a	1.0 ± 0.01a
AS 2 mM	1.8 ± 0.3ab	1.0 ± 0.01d	82.0 ± 0.3bc	3.2 ± 0.3a	1.0 ± 0.01a
H ₂ O ₂ 10 mM	1.6 ± 0.1bc	0.5 ± 0.01d	88.0 ± 0.1abc	2.7 ± 0.1a	1.0 ± 0.01a
H ₂ O ₂ 20 mM	1.1 ± 0.2d	0.9 ± 0.02bc	89.5 ± 0.1ab	3.0 ± 0.1a	1.0 ± 0.01a
H ₂ O ₂ 30 mM	1.3 ± 0.2cd	0.7 ± 0.01cd	79.9 ± 0.1c	3.3 ± 0.2a	1.0 ± 0.01a

Los datos se expresan como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia significativa con la prueba de Tukey (P<0.05)

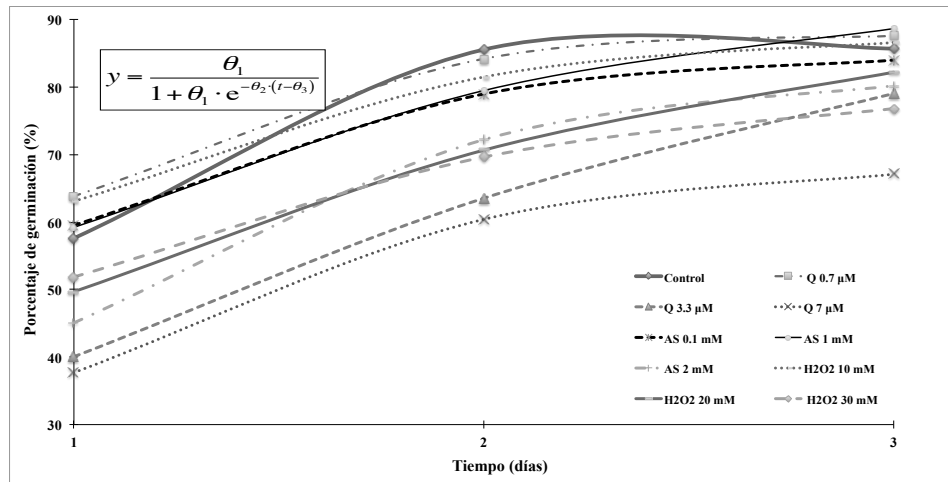


Figura 15. Efecto del uso de quitosano (0.7, 3.3 y 7 µM), ácido salicílico (0.1, 1.0 y 2.0 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM) sobre el porcentaje de germinación en la variedad Flor de junio Dalia. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

La semilla en el proceso de germinación al estar sujeta a estrés químico ocupa su capacidad metabólica para protegerse del estrés lo cual podría disminuir su

actividad de crecimiento (Prasch y Sonnewald, 2014). Por este motivo, se esperaría que aunque sean menos las semillas germinadas, se podría mejorar el perfil de metabolitos benéficos para la salud.

Por otro lado, el tamaño de radícula es influenciado por el medio ambiente que rodea a la semilla, incluyendo la exposición a sustancias químicas, las cuales podrían mejorar este parámetro (Anaya y col., 2015). En la Figura 16, se puede observar la cinética del modelo del tamaño de radícula, representada por la ecuación $y = a \exp(bt)$, donde “a” representa el tamaño de radícula al tiempo 0, y “b” la tasa de crecimiento de la radícula. Aunque los resultados no muestran diferencias significativas en ambos parámetros (Cuadro 8), en la Figura 16, se puede observar que al tercer día algunos tratamientos tienen una mayor tasa de crecimiento, alcanzando los mayores tamaños de radícula (AS 0.1, 1 y 2 mM, así como, H₂O₂ 10, 20 y 30 mM).

El ácido salicílico es un compuesto fenólico antioxidante que ha mostrado ser un potente inductor en plantas. Este compuesto se encuentra de manera natural en las plantas, y participa en la regulación de procesos fisiológicos tales como, crecimiento celular, respiración, germinación de semillas y desarrollo de plántulas (Rivas-San Vicente y col., 2011). Por otro lado, se ha reportado que el AS, interviene en mecanismos de señalización estimulando la pared celular de la radícula (Janda y Ruelland, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que los tratamientos a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, rompe la dormancia de las semillas y promueve la germinación, causando un desbalance hormonal en la célula vegetal a favor de la germinación y crecimiento radicular (Çavusoglu & Kabar, 2010).

En base a los resultados, se puede concluir que si bien los inductores usados para este experimento no incrementan el porcentaje de germinación de esta variedad de frijol, si mejoran el vigor de la misma.

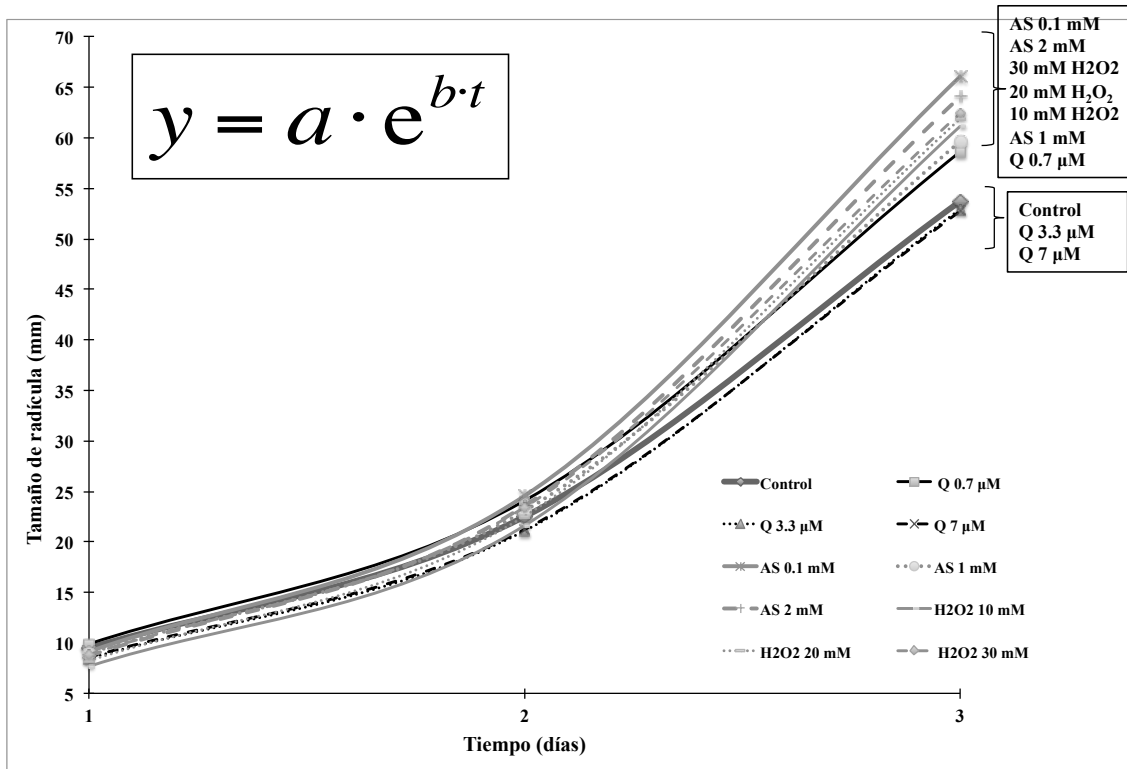


Figura 16. Efecto del uso de quitosano (0.7, 3.3 y 7 μM), ácido salicílico (0.1, 1.0 y 2.0 mM) y peróxido de hidrógeno (10, 20 y 30 mM) sobre el tamaño radicular en la variedad Flor de junio Dalia. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

7.3 Efecto de la inducción química sobre el contenido de compuestos anti nutricos del frijol

El valor nutricional de la semilla de frijol puede estar limitado por la presencia de diversos componentes antinutricos, los cuales afectan la absorción de minerales y vitaminas, así como, la digestibilidad de proteínas. Debido a lo anterior, se determinó el contenido de los principales componentes antinutricos presentes en el frijol, los cuales se presentan en el Cuadro 9.

El proceso de germinación no disminuyó significativamente el contenido de lectinas comparado con la semilla sin germinar, sin embargo, todos los tratamientos de estrés químico decrecen significativamente estos compuestos (26-48 % respecto a la semilla cruda).

Además, en el Cuadro 9, se observa que el contenido de inhibidores de tripsina fue reducido significativamente por el proceso de germinación (41 %) comparado con la semilla sin germinar. Adicionalmente, los tratamientos con aplicación de los inductores químicos, Q 3.3 y 7 μM , AS 2 mM y H_2O_2 20 y 30 mM presentan la mayor reducción de estos componentes (51-57 % comparado con la semilla cruda).

Un comportamiento similar fue mostrado para inhibidores de alfa amilasa, los cuales disminuyeron durante el proceso de germinación (35 % respecto a la semilla cruda), siendo las concentraciones más altas de cada inductor (Q 3.3 y 7 μM , AS 1 y 2mM, y H_2O_2 20 mM y 30 mM) los tratamientos con menor contenido de estos compuestos (reducidos hasta 46 % respecto a la semilla cruda).

Diversos cambios metabólicos ocurren durante la germinación, entre los cuales se encuentra, la reducción de componentes de reserva de naturaleza proteica, como las lectinas y los inhibidores de tripsina y amilasa (Shimelis y Rakshit, 2007; Swieca y col.,2013), esto se debe a la necesidad de producir componentes estructurales como los aminoácido y péptidos necesarios para formar nuevas estructuras celulares y/o como fuente de energía necesaria para el activo proceso de respiración en la etapa germinativa (Rojas y col., 2014).

Por otro lado, la germinación reduce el contenido de ácido fítico hasta 36 % respecto a la semilla sin germinar, así como, la inducción química con los tratamientos Q 3.3 y 7 μM , y todos los tratamientos de AS. El ácido fítico, es la fuente más importante de fósforo en la semilla. Durante la germinación este compuesto disminuye en concentración, como consecuencia de la actividad de fitasas que lo degradan por la necesidad de usarlo como fuente de energía, ya que se ha reportado una mayor demanda energética durante situaciones de estrés en las células vegetales (Rojas y col., 2014).

Cuadro 9. Concentración de compuestos antinutricios en germinados de frijol tratados con diferentes inductores.

Tratamientos	Actividad hemaglutinante (HU g ⁻¹)	Inhibidores de tripsina (TIU mg ⁻¹)	Inhibidores de α-Amilasa (AIU mg ⁻¹)	Ácido fítico (mg g ⁻¹)
Semilla cruda	0.50 ± 0.01a	3.92 ± 0.08a	301.2 ± 1.2a	25.61 ± 0.02a
¹ Germ.control	0.47 ± 0.04a	2.30 ± 0.09b	196.3 ± 3.5f	16.42 ± 0.04b
Q 0.7 μM	0.37 ± 0.05b	2.31 ± 0.06bc	201.0 ± 2.6e	14.91 ± 0.02c
Q 3.3 μM	0.34 ± 0.04b	2.06 ± 0.04cde	167.8 ± 4.3h	13.54 ± 0.04f
Q 7 μM	0.34 ± 0.01b	1.93 ± 0.03ef	176.4 ± 5.1g	11.12 ± 0.05i
SA 0.1 mM	0.26 ± 0.01b	2.50 ± 0.04b	245.0 ± 2.8b	12.53 ± 0.06g
SA 1 mM	0.29 ± 0.01b	2.26 ± 0.08bcd	217.0 ± 3.3d	11.82 ± 0.02h
SA 2 mM	0.32 ± 0.01b	1.79 ± 0.05ef	152.8 ± 3.4i	11.14 ± 0.03i
H ₂ O ₂ 10 mM	0.28 ± 0.01b	2.04 ± 0.03cde	222.4 ± 1.6c	13.42 ± 0.08f
H ₂ O ₂ 20 mM	0.33 ± 0.01b	1.97 ± 0.05def	177.6 ± 2.8g	13.70 ± 0.02e
H ₂ O ₂ 30 mM	0.33 ± 0.01b	1.68 ± 0.02f	179.5 ± 4.4g	14.23 ± 0.02d

Los datos se expresan como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia significativa (P≤0.05) con la prueba de Tukey. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

7.4 Efecto de la inducción química sobre el contenido de compuestos nutraceuticos y capacidad antioxidante del frijol.

Durante la germinación se llevan a cabo diversos procesos bioquímicos, que resultan en cambios en la composición de metabolitos primarios y secundarios. Estos cambios pueden observarse también en el perfil de compuestos fenólicos.

El Cuadro 10, se muestra el efecto de la aplicación de los inductores sobre el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y saponinas totales. Los compuestos fenólicos totales y flavonoides se incrementaron significativamente durante el proceso de germinación (23 y 30 % respectivamente), mientras que la concentración de los taninos condensados disminuyó (22 %) comparado con la semilla cruda. Resultados similares se han reportado previamente en leguminosas (Guajardo-Flores y col., 2012).

Adicionalmente, los compuestos fenólicos se incrementaron con la aplicación de H₂O₂ 30 y 20 mM, así como AS 2mM; 1.8, 1.6 y 1.5 veces respectivamente,

comparados con la semilla cruda. Por otro lado, los flavonoides totales se incrementaron principalmente en los tratamientos de AS 2 mM y 7 μ M (3 and 2-veces, respectivamente) comparado con la semilla cruda. Se ha reportado que el AS incrementa la concentración de H_2O_2 (Janda y Ruelland, 2014), el cual actúa como un segundo mensajero, promotor de estrés oxidativo, y tiene un papel en la transducción de señales en vías metabólicas importantes como la de los fenilpropanoides y shikimato. Se ha sugerido, que tratamientos con H_2O_2 induce la actividad de las enzimas, fenilalanina-amonio liasa (PAL) y tirosina-amonio liasa (TAL), las cuales son importantes en la biosíntesis de compuestos polifenólicos en la vía del ácido shikimico. Por otro lado se ha reportado que diversas especies de plantas tratadas con quitosano, presentan una respuesta oxidativa moderada, inducida por la producción de peróxido de hidrógeno (Lin y col., 2005), se sugiere que esta respuesta, induce enzimas de defensa, como las ya mencionadas PAL y TAL. Adicionalmente, se ha correlacionado la inducción de PAL, con la acumulación de compuestos polifenólicos, después de la aplicación de tratamientos con quitosano en soya (*Glycine max L.*) (Khan y col., 2003).

Por otro lado, la inducción química, disminuye significativamente el contenido de taninos en la mayoría de los tratamientos. Reddy y col. (1985), reportaron que la inmersión de semillas en agua durante toda una noche, seguida de un proceso de germinación reduce significativamente el contenido de taninos hasta en un 50 % en una gran variedad de leguminosas, lo cual se ha relacionado con procesos de hidrólisis por polifenolasas y/o asociaciones hidrofóbicas con proteínas de las semillas (Reddy y col.,1985; Sharma y Sehgal., 1992). Actualmente, no existe información del efecto del estrés químico sobre el contenido de taninos.

Adicionalmente, el proceso de germinación, incrementa el contenido de saponinas totales hasta en un 41 % respecto a la semilla cruda. Las saponinas son triterpenos almacenados en el hipocotilo de las leguminosas como conjugados glicosilados. Durante la germinación, los complejos de saponinas

son hidrolizados y posteriormente las saponinas libre se incrementan (Jyothi y col., 2007). Estos cambios se han reportado en germinados de frijol negro, en los cuales se han incrementado estos compuestos hasta 1.9 veces comparado con semillas crudas (Guajardo-Flores y col., 2012).

Cuadro 10. Concentración de compuestos fenólicos en germinados de frijoles tratados con diferentes inductores

Tratamientos	Fenoles (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoides (mg (+)Cat Eq g ⁻¹)	Taninos condensados (mg (+)Cat Eq g ⁻¹)	Saponinas (mg g ⁻¹)
Semilla cruda	48.0 ± 1.1e	3.0 ± 0.3e	38.9 ± 0.4a	10.3 ± 1.8i
¹ Control	59.1 ± 1.8c	3.9 ± 0.2cd	30.0 ± 1.9b	14.5 ± 2.6ef
Q 0.7 µM	48.5 ± 2.3e	4.5 ± 0.3cd	15.9 ± 0.5e	13.2 ± 3.1gh
Q 3.3 µM	50.4 ± 1.3de	4.5 ± 0.1cd	14.8 ± 0.6e	15.6 ± 2.0cd
Q 7 µM	62.8 ± 1.9c	6.4 ± 0.4b	19.9 ± 0.8de	17.8 ± 1.8ab
AS 0.1 mM	57.6 ± 2.0cd	3.7 ± 0.3d	26.0 ± 2.2bc	14.0 ± 2.6fg
AS 1 mM	57.3 ± 0.5cd	5.0 ± 0.3c	24.2 ± 0.4cd	18.2 ± 1.2a
AS 2 mM	72.3 ± 4.8b	8.5 ± 0.8 ^a	22.9 ± 0.5cd	12.2 ± 2.3h
H ₂ O ₂ 10 mM	61.3 ± 1.7c	4.9 ± 0.6c	23.0 ± 0.8c	15.4 ± 1.9cde
H ₂ O ₂ 20 mM	77.0 ± 3.6b	4.3 ± 0.3cd	27.2 ± 1.1bc	15.2 ± 1.6def
H ₂ O ₂ 30 mM	87.7 ± 4.9a	4.4 ± 0.4cd	37.3 ± 0.9a	16.0 ± 2.2bc

Los datos se expresan como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia significativa (P≤0.05) con la prueba de Tukey.. (Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El mayor contenido de saponinas fue observado en los tratamientos Q 3.3 y 7 µM, AS 1mM y H₂O₂; 8 %, 72 %. 77 % and 55 % respectivamente, comparados con la semilla cruda. Como se ha descrito previamente, el AS, Q y H₂O₂, generan un estado oxidativo que se caracteriza por la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS) en los cloroplastos y mitocondrias, debido a ello, las plantas emplean un sistema de defensa antioxidante que incluye enzimas y otros componentes que tienen la finalidad de atrapar o neutralizar a los ROS y NOS. En este sentido, se ha reportado que las saponinas, especialmente las triterpenoideas, desempeñan un papel importante en la actividad antioxidante, dentro de la célula vegetal (Okubo y Yoshiki, 2000). Aunque no existen reportes de cómo el AS, Q ó H₂O₂ pudieran participar en la síntesis de saponinas, se ha reportado que bajo condiciones de

estrés se encuentran activadas enzimas como la oxido-escualeno ciclasa, escualeno sintasa y demarenediol sintasa, que son enzimas involucradas en la síntesis de triterpenoides (CA Yendo y col., 2014).

En el Cuadro 11 se presenta la capacidad antiradical porcentual que presentan los germinados. Respecto a la inhibición del radical DPPH se puede observar que entre el germinado control y el frijol crudo no existe diferencia significativa. Sin embargo, todos los tratamientos presentaron una mayor capacidad antioxidante respecto a los controles. Existe evidencia que demuestra que la germinación modifica el contenido fitoquímico del frijol, convirtiéndolo en una interesante mezcla de compuestos antioxidantes con propiedades benéficas a la salud como son los compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas (Guajardo-Flores y col., 2012; Lin y Lai, 2006; Lopez-Amoros y col., 2013).

Cuadro 11. Inhibición porcentual del radical ABTS y DPPH de germinados de frijol Flor de junio Dalia

Tratamientos	Inhibición DPPH (%)	Inhibición ABTS (%)
Semilla cruda	40.3 ± 1.3e	33.9 ± 2.0ab
¹ Control	40.5 ± 1.8de	25.4 ± 2.8b
Q 0.7 µM	55.4 ± 3.4a	31.0 ± 1.5ab
Q 3.3 µM	52.4 ± 3.2ab	36.3 ± 2.5a
Q 7 µM	52.8 ± 0.5abc	30.1 ± 0.1ab
SA 0.1 mM	48.1 ± 4.7ab	33.8 ± 0.5ab
SA 1 mM	54.5 ± 0.7ab	27.8 ± 0.9ab
SA 2 mM	51.3 ± 0.3bc	31.2 ± 3.7ab
H ₂ O ₂ 10 mM	50.1 ± 0.4bc	27.5 ± 1.1ab
H ₂ O ₂ 20 mM	46.9 ± 0.9cd	26.3 ± 2.5ab
H ₂ O ₂ 30 mM	50.0 ± 1.8bc	29.7 ± 1.9ab

Los datos se expresan como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia significativa (P≤0.05) con la prueba de Tukey. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Adicionalmente, se puede apreciar que el germinado control tuvo una menor capacidad de inhibir al radical ABTS respecto al frijol crudo. En este sentido ninguno de los tratamientos mejoró la capacidad antioxidante del frijol crudo.

En esta parte experimental, se llevó a cabo un análisis de estrellas, para definir los tratamientos que presentaron menor contenido de compuestos antinutricios y mayor cantidad de componentes nutraceuticos. En la Figura 17 se puede observar, que los germinados inducidos químicamente a las mayores concentraciones de todos los inductores, mejoraron sus características nutraceuticas y nutricionales.

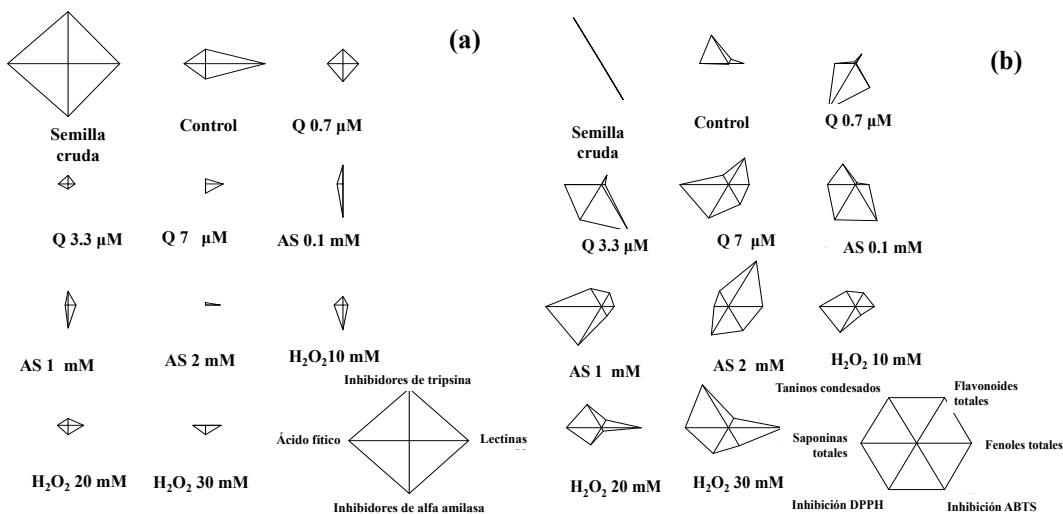


Figura 17. Componentes principales de, (a) compuestos antinutricios, (b) compuestos nutraceuticos presentes en frijoles inducidos químicamente. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Con la información anterior se seleccionaron los materiales que presentaron la mayor reducción de compuestos antinutricios y mayor contenido nutraceutico, a los que adicionalmente se les determinó un perfil de compuestos polifenolicos, saponinas y fitoesteroles. Los resultados se muestran en el Cuadro 12, donde se puede apreciar que los principales compuestos identificados en este estudio fueron ácidos fenolicos y flavonoides. La mayoría de estos compuestos se incrementan durante la germinación. Las semillas inducidas con AS,

presentaron el incremento más importante de compuestos polifenólicos, siendo los ácidos clorogénico, hidroxibenzoico, protocatecuico y cumárico los encontrados en mayor concentración en estos tratamientos. Respecto a los flavonoides, también el AS incrementó al componente genisteína, daidzeína, hesperidina y rutina, comparado con el germinado control.

Además, la germinación incrementa significativamente la concentración de soyasaponina I, sin embargo, la mayoría de los tratamientos con inductores químicos reducen su contenido. De manera importante los germinados tratados con AS 2 mM, presentó un contenido de soyasaponina I, similar al germinado control. Respecto a los fitoesteroles, el fucosterol fue incrementado por el tratamiento de quitosano 7 μ M, mientras que el β -sitosterol y β -campesterol fueron incrementados por el tratamiento de peróxido de hidrógeno respecto al germinado control. Mientras que los tratamientos de ácido salicílico tuvieron un mayor efecto sobre el incremento de 7 Δ -avenasterol, así como, el campesterol-3- β -glucopiranosido y estigmasterol-3- β -glucopiranosido.

Cuadro 12. Perfil de compuestos fitoquímicos de germinados inducidos químicamente.

Compuesto	Rt (min)	Germinado control	AS 1 mM	AS 2 mM	Q 7 µM	H ₂ O ₂ 30 mM
Ácidos fenólicos						
Dicafeoilquínico	1.8	83.9 ± 2.5	159.2 ± 0.2	252.2 ± 2.4	159.1 ± 2.0	169.0 ± 1.2
Clorogénico	1.9	24.4 ± 0.2	33.9 ± 0.2	82.7 ± 1.2	31.3 ± 0.4	35.3 ± 1.0
Gálico	3.9	8.80 ± 0.3	18.8 ± 0.1	18.1 ± 0.1	4.8 ± 0.3	19.7 ± 0.4
4-Hidroxibenzoico	4.5	19.0 ± 0.2	34.8 ± 0.2	35.7 ± 0.1	25.1 ± 0.1	26.2 ± 0.3
Caféico	13.9	6.30 ± 0.1	14.7 ± 0.1	28.9 ± 0.2	25.4 ± 0.1	23.9 ± 0.6
Protocatecuico	14.6	11.0 ± 0.2	16.0 ± 0.0	16.4 ± 0.2	LDL	LDL
Cumárico	16.5	49.9 ± 0.1	94.8 ± 0.0	90.0 ± 0.2	69.4 ± 0.5	85.2 ± 1.2
Ferúlico	20.1	2.70 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.1 ± 0.0	5.6 ± 0.1	7.5 ± 0.3
Sinápico	21.3	5.90 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2
Flavonoides						
Epicatequina	2.6	7.70 ± 0.0	9.80 ± 0.1	8.4 ± 0.2	10.3 ± 0.1	9.7 ± 0.1
Catequina	3	7.20 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.3 ± 0.1	7.7 ± 0.1	11.4 ± 0.5
Genisteína	5.2	60.0 ± 1.7	119.7 ± 0.7	164.5 ± 0.6	136.3 ± 0.8	138.3 ± 1.0
Daidzeina	5.5	37.9 ± 0.2	78.4 ± 0.7	97.3 ± 0.3	68.8 ± 1.2	59.5 ± 1.8
Hesperidina	22.8	10.6 ± 0.1	22.2 ± 0.2	19.2 ± 0.1	14.6 ± 0.2	10.3 ± 0.2
Rutina	26.7	55.6 ± 0.8	87.3 ± 0.1	115.0 ± 1.4	60.5 ± 0.2	60.7 ± 0.3
Saponinas						
Faseosido I	9.9	5.00 ± 0.1	5.50 ± 0.0	6.70 ± 0.0	4.5 ± 0.2	5.80 ± 0.1
Soyasaponina Bb (I)	11.7	19.2 ± 0.3	17.1 ± 0.2	21.0 ± 0.1	16.2 ± 0.1	12.9 ± 0.8
Soyasaponina βg	26.6	9.40 ± 0.1	10.6 ± 0.1	8.50 ± 0.1	11.9 ± 0.1	8.00 ± 0.0
Soyasaponina αg	27.3	6.20 ± 0.1	7.70 ± 0.1	6.40 ± 0.0	8.2 ± 0.1	5.60 ± 0.1
Fitoesteroles						
Fucosterol	2.7	7.50 ± 0.1	7.60 ± 0.4	10.8 ± 0.4	35.0 ± 0.7	6.60 ± 0.1
β-Sitosterol	7.3	19.4 ± 0.2	21.2 ± 0.4	22.1 ± 0.2	20.3 ± 0.6	39.7 ± 1.2

β -Campesterol	8.7	9.80 \pm 0.2	8.40 \pm 0.2	9.30 \pm 0.5	7.00 \pm 0.2	15.3 \pm 0.6
Δ 7-Avenasterol	16.9	72.3 \pm 0.4	79.9 \pm 0.4	68.4 \pm 1.0	71.0 \pm 2.2	69.5 \pm 1.1
Campesterol-3- β -glucopiranosido	20.4	66.6 \pm 1.6	95.5 \pm 1.4	74.5 \pm 0.4	58.6 \pm 1.2	68.7 \pm 1.1
Stigmasterol-3- β -glucopiranosido	20.7	10.7 \pm 0.1	27.9 \pm 0.6	28.1 \pm 0.8	26.5 \pm 0.3	23.5 \pm 0.9

Los datos se expresan como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

7.5 Composición proximal de germinados de frijol FJ Dalia inducidos químicamente.

Para evaluar la calidad nutrimental de los germinados que fueron usados en el estudio *in vivo* se llevó a cabo un análisis proximal. En el siguiente Cuadro se presentan los resultados del análisis proximal, donde se puede observar que hubo diferencias importantes en el contenido de lípidos, los cuales disminuyeron con la germinación. Durante la germinación la demanda de estructuras básicas para la construcción de nuevas biomoléculas es indispensable, ya que se requiere para la reestructuración de la planta que está por emerger. Los lípidos juegan un papel esencial mediante la ruta del glioxilato, que trae como resultado la producción de moléculas de acetil CoA, que servirán para la estructuración de carbohidratos, necesarios para formar la pared celular de radícula y hojas. En este sentido, también se puede observar un incremento en la fibra cruda, como resultados de las nuevas estructuras formadas principalmente de estos componentes.

Cuadro 13. Composición proximal de frijol germinado inducido químicamente

	Semilla cruda	Germinado control	AS 1 mM	AS 2 mM	Q 7 µM	H ₂ O ₂ 30 mM
Humedad	12 ± 0.8a	11 ± 0.3a	12 ± 0.1a	12 ± 0.4a	12 ± 0.7a	12 ± 0.4a
Carbohidratos	56.0 ± 0.6a	53.2 ± 0.7a	54.1 ± 0.1a	52.0 ± 0.2a	52.7 ± 0.1a	54.1 ± 0.1a
Cenizas	3.4 ± 0.1a	3.9 ± 0.1a	3.9 ± 0.4a	3.8 ± 0.7a	3.9 ± 0.2a	3.1 ± 0.5a
Nitrógeno	3.8 ± 0.1a	3.6 ± 0.4a	3.2 ± 0.3b	3.2 ± 0.1a	3.7 ± 0.2a	3.7 ± 0.2a
Proteína	21.3 ± 0.4ab	22.4 ± 0.1a	21.7 ± 0.3ab	23.8 ± 0.3a	22.3 ± 0.1a	21.9 ± 0.2ab
Grasa	1.8 ± 0.2a	1.2 ± 0.2b	1.2 ± 0.3b	1.0 ± 0.1c	1.1 ± 0.3bc	1.3 ± 0.3ab
Fibra cruda	1.6 ± 0.1c	3.1 ± 0.3b	3.8 ± 0.4a	4.1 ± 0.3a	3.9 ± 0.1a	3.8 ± 0.3a

Los datos se expresan como porcentaje. (Q) quitosano, (AS) ácido salicílico y (H₂O₂) peróxido de hidrógeno.

7.6 Efecto del consumo de germinados de frijol FJ Dalia inducidos químicamente en un modelo de dislipidemia y su relación con los componentes fitoquímicos presentes en ellos.

7.6.1 Efecto del consumo de los germinados sobre la ganancia de peso corporal en el modelo animal.

En la Figura 18, se presentan los resultados del peso corporal de las ratas a través del tiempo (3 meses). Se puede observar que en el primer mes se presentó un incremento de peso corporal del 10 %, del grupo alimentado con la dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) respecto al grupo sano, y en el último mes del experimento, se observó una diferencia de 12 % entre ambos grupos. Además, se puede apreciar que todos los grupos alimentados con los germinados control e inducidos químicamente, desde el primer mes presentan una disminución significativa en la ganancia de peso respecto a los grupos sano y DAGF, siendo los grupos alimentados con los germinados control y H₂O₂ 30 mM, los que ganaron significativamente menos peso respecto a los controles DAGF y sano; 20 y 9 % respectivamente. Sin embargo, los grupos alimentados con los germinados AS 1 y 2 mM, así como Q, presentaron una ganancia de peso significativamente similar al control sano, al final del experimento.

Es importante resaltar que los grupos germinado control y H₂O₂ 30 mM presentan un peso ligeramente menor al grupo sano, lo cual podría deberse a la presencia de algún inhibidor no cuantificado como la quimiotripsina, sin embargo estos dos grupos de ratas tienen un peso adecuado para su edad, de acuerdo con las curvas de crecimiento de ratas Wistar de Harlan.

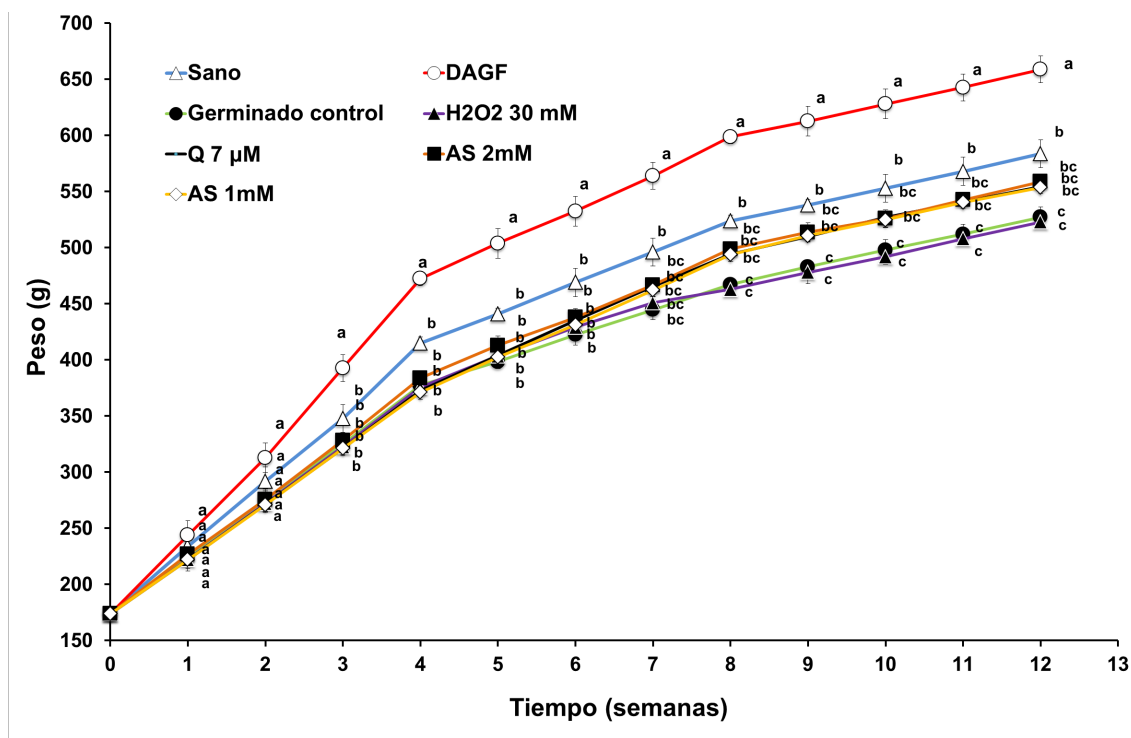


Figura 18. Peso corporal de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementada con germinados de frijol. Los datos se expresan como la media \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Por otro lado, en la Figura 19 se muestra el consumo de alimento de las ratas tratadas y controles. Se puede observar que el consumo de los germinados no afectó la cantidad de alimento consumido, debido a que todos los grupos con dieta obesogénica (dieta alta en grasa y fructosa), con y sin germinado, presentan un consumo de alimento similar estadísticamente durante todo el experimento.

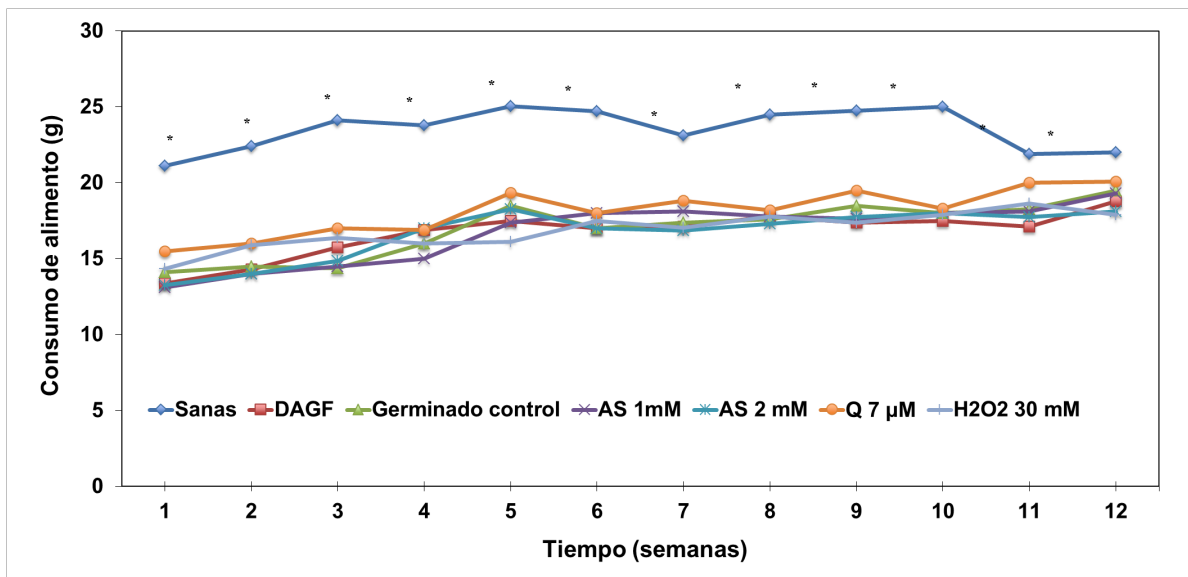


Figura 19. Consumo de alimento de ratas dislipidémicas tratadas y controles. Los datos se expresan como la media \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Dunnett. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Por otro lado, la adición de grasa y fructosa en las dietas promueve el incremento en el peso corporal debido a la acumulación de lípidos en el tejido adiposo. Por esta razón, se evaluó la estructura del tejido adiposo en los grupos tratados y controles por medio de un análisis histológico y la medición del diámetro de los adipocitos. En las Figuras 20 (a y b) se puede observar, que el grupo DAGF presenta un incremento de un 27.5 % en el diámetro de los adipocitos comparado con el grupo sano. Mientras que los grupos alimentados con el germinado control e inducidos, presentaron una reducción del 21 al 24 % en el diámetro de las células adiposas comparadas con el grupo DAGF.

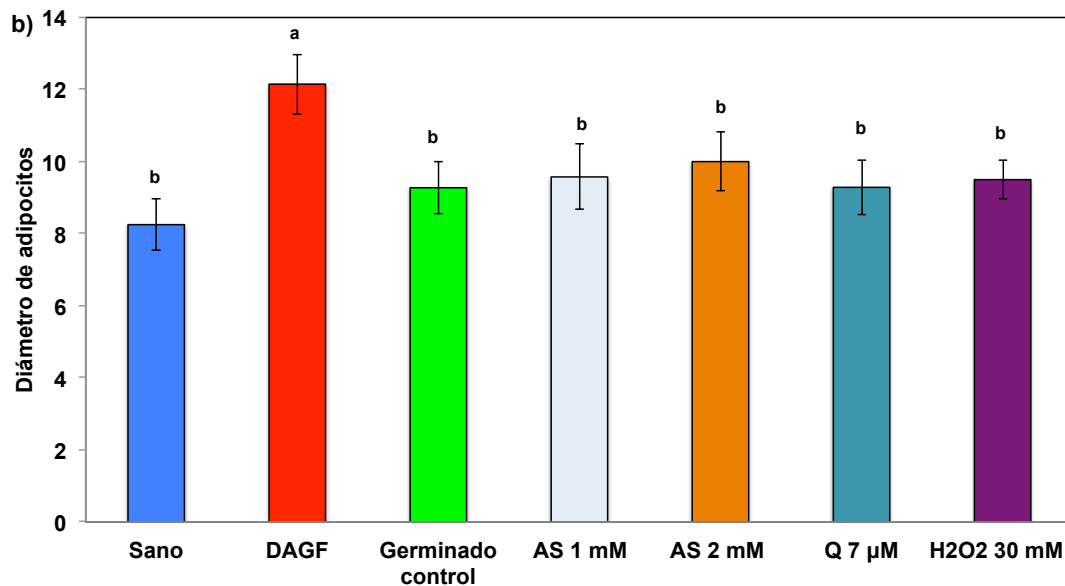
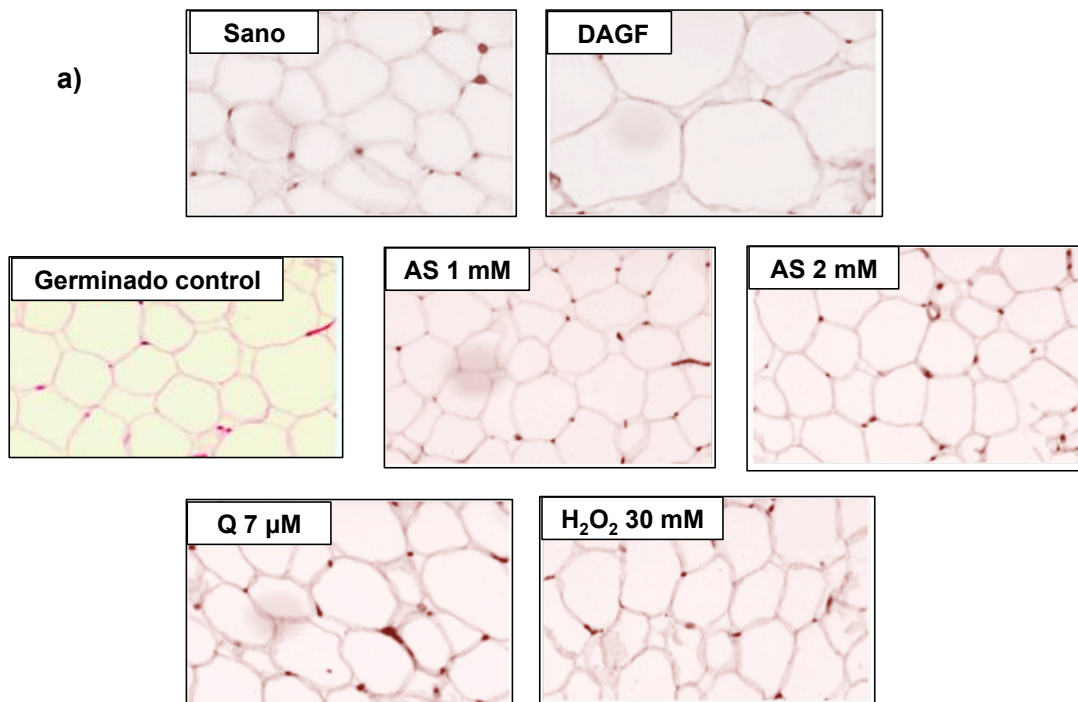


Figura 20. Micrografías de tejido adiposo con tinción de hematoxilina y eosina, en ampliación 200X (a), y cuantificación del diámetro de los adipocitos (b), de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementada con germinados de frijol. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El consumo de los germinados disminuye significativamente la ganancia de peso corporal, lo cual se ve parcialmente explicado por el menor almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, sin embargo este efecto es similar en los grupos alimentados con el germinado control y los germinados inducidos, lo cual sugiere que el efecto no es mejorado por la inducción química.

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar los posibles compuestos, presentes en los germinados, relacionados con el efecto que tiene el consumo de germinados en el desarrollo de la dislipidemia en un modelo obesogénico, para lo cual se implementó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA por sus siglas en inglés).

En la Figura 21 se puede observar la relación entre el perfil fitoquímico y el peso corporal de las ratas alimentadas con los germinados con y sin inducción química. Los coeficientes de regresión del modelo obtenido por PLSA-DA (Figura 21), mostró que la reducción del peso corporal de las ratas de los diferentes grupos tratados con los germinados de frijol, está asociada a compuestos tales como ácido gálico y sinápico, la saponina faseosido I y los fitoesteroles β -sitosterol y β -campesterol.

Se ha reportado que los compuestos fenólicos de la dieta disminuyen significativamente la obesidad a través de la apoptosis del tejido adiposo, inhibiendo de esta manera el almacenamiento lipídico (Hsu y Yen, 2008). Aunque el mecanismo específico del ácido gálico aún se desconoce, se ha reportado que este ácido fenólico ejerció un efecto en el control de la obesidad de ratones (Doan y col., 2014). Mientras que el efecto del ácido sinápico, sobre la obesidad no se ha reportado anteriormente. También las saponinas pueden ejercer efectos antiobesogénicos, ya que inhiben a la lipasa pancreática a nivel intestinal y regular el proceso de lipogénesis en el hígado (Marrelli y col., 2016).

El β -sitosterol y β -campesterol son los fitoesteroles más abundantes en el frijol. Los fitoesteroles son fermentados en el colón y los productos de fermentación ejercen

inhibición de lipogénesis en hígado, así como la activación de beta oxidación en el mismo (Chavez-Santoscoy y col., 2013).

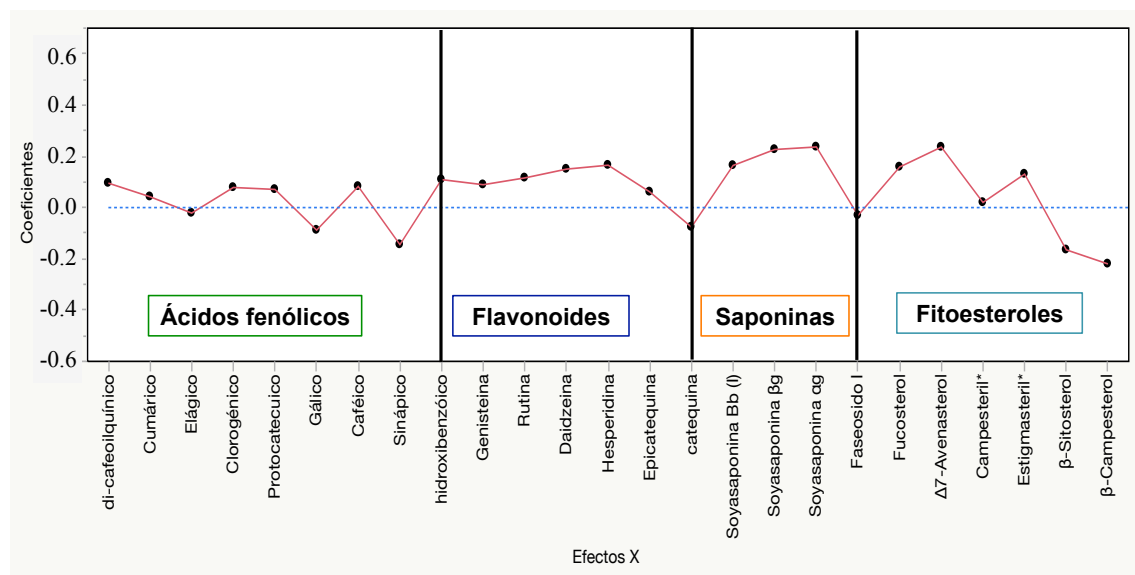


Figura 21. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la reducción del peso corporal.

7.6.2 Efecto del consumo de germinados inducidos sobre el perfil lipídico de ratas dislipidémicas.

En la obesidad se presenta un estado de dislipidemia, caracterizado por niveles elevados de triglicéridos, LDL (lipoproteínas de baja densidad) y bajos niveles de HDL (Franssen y col., 2011).

Los resultados de la cuantificación del perfil lipídico se muestran en el Cuadro 14, se puede observar que el nivel de triglicéridos del grupo DAGF se incrementó 2.5 veces respecto al grupo sano. Mientras que el consumo de germinado control redujo 38 % el contenido sérico de triglicéridos cuando se compara con el grupo DAGF. Sin embargo, los grupos alimentados con germinados inducidos químicamente, ejercieron un efecto similar en la reducción de triglicéridos que el grupo del germinado control.

Respecto a las concentraciones de LDL en suero, se puede apreciar que en el grupo DAGF se incrementó 2.4 veces cuando se compara con el grupo sano, mientras que el consumo de los germinados control y AS, disminuyeron los niveles en un 23 y 27 % respectivamente comparados con el grupo DAGF. Por otro lado, el colesterol total no presentó modificaciones fisiológicamente importantes, ya que los niveles presentados en todos los grupos se mantienen por debajo de los límites altos que son 180-200 mg/dL. Mientras que los niveles de HDL en todos los grupos tratados permanecen similares que el grupo sano.

Cuadro 14. Perfil de lípidos de ratas control y alimentadas con germinados de frijol inducidos.

	Triglicéridos	Colesterol Total	HDL	LDL
Sanas	83.0 ± 14d	99.1 ± 8b	63.8 ± 10a	64.4 ± 13c
DAGF	212.2 ± 34 a	119.3 ± 3a	42.2 ± 6b	157.5 ± 29a
Germinado control	130.2 ± 18bc	99.1 ± 6b	44.5 ± 6b	113.6 ± 9b
AS 1mM	97.1 ± 17cd	99.3 ± 7b	47.0 ± 7b	120.3 ± 21b
AS 2 mM	105.9 ± 10cd	104.2 ± 9b	52.0 ± 4b	140.2 ± 17ab
Q 7 µM	104.0 ± 11cd	101.8 ± 15b	48.7 ± 4b	134.1 ± 15ab
H₂O₂ 30mM	165.4 ± 14b	102.1 ± 10b	48.8 ± 3b	143.0 ± 18ab

Los datos se expresan como la media ± DE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

A continuación se muestra el gráfico de los coeficientes de regresión del modelo obtenido por PLSA-DA (Figura 22), que relaciona el perfil fitoquímico con la reducción del contenido de triglicéridos y LDL, donde se puede observar que los compuestos asociados a la reducción de estos parámetros, son los ácidos cumárico, protocatecuico, gálico, sinápico y 4-hidroxibenzoico, así como la hesperidina, y epicatequina. Además las saponinas I, α g y β g; así como los fitoesteroles fucosterol, Δ 7 avenasterol, campesterol y estigmasteril β -glucopiranosido.

Los ácidos cumárico y protocatecuico se han relacionado con la activación de la beta oxidación vía la AMPK (Yoon y col 2013; Sudeep y col., 2016; Kakkar y Bais,

2014). Adicionalmente el ácido protocatecuico, tiene el potencial de reducir significativamente los niveles de colesterol LDL (Kakkar & Bais, 2014). Mientras que el ácido sinápico, usado en el control del estrés oxidativo, no existen reportes sobre sus efectos en la reducción de los lípidos anteriormente mencionados, como tampoco lo ha sido para el ácido hidroxibenzoico.

Recientemente se ha asociado un efecto hipolipidémico al flavonoide hesperidina, principalmente en la reducción de colesterol (Selvaraj y Pugalendi, 2012). Se ha reportado que este flavonoide reduce la actividad de enzimas como la reductasa 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) y la acetil colesterol acil transferasa (ACAT), además de participar inactivando al receptor de LDL (Akiyama y col., 2009). Respecto al flavonoide catequina su efecto hipolipidémico se ha asociado a la inhibición de la absorción de los mismos en el intestino (Koo y Noh, 2007).

Las saponinas presentes en el frijol han sido relacionadas con su poder reductor de colesterol (Ramírez-Jiménez y col., 2014). Sin embargo las saponinas como se ha mencionado anteriormente pueden inhibir la absorción lípidos a nivel intestinal, además de disminuir la actividad de la lipogénesis (Marrelli y col., 2016).

Además, respecto a los fitosteroles del frijol, se ha reportado que tienen efecto en la inactivación de enzimas de lipogénesis y activación de enzimas de beta oxidación en hígado (Chavez-Santoscoy y col., 2013). Lo cual contribuye a la reducción de triglicéridos en sangre.

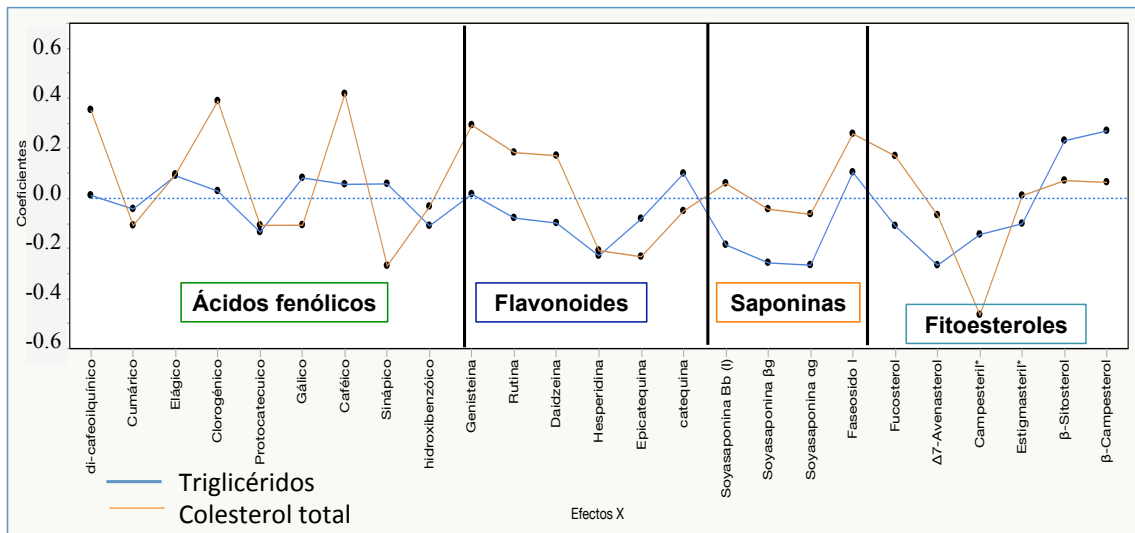


Figura 22. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la reducción del triglicéridos y colesterol total.

7.6.3 Contenido de triglicéridos en heces e inhibición de lipasa pancreática

Las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, normalmente incrementan la absorción de lípidos a nivel intestinal. Debido a esto se eleva el nivel de lípidos almacenados y sintetizados en el hígado, lo cual se ve reflejado en un valor elevado de triglicéridos en suero. La reducción de lípidos observada anteriormente en los resultados, pueden sugerir que el consumo de germinados puede mejorar el estado de dislipidemia en este tipo de modelos. Este efecto podría estar relacionado con la capacidad de los germinados de inhibir la digestión y/o absorción de lípidos a nivel intestinal, debido a esto, se evaluó el contenido de triglicéridos en heces.

Respecto a esto, se pudo observar que el grupo DAGF excreta una mayor cantidad de lípidos en heces, en relación con el grupo sano, esto debido al consumo de la dieta alta en grasa que consume el grupo DAGF. Mientras que los grupos tratados con los germinados, que de igual manera consumen una dieta alta en grasa, presentan también una mayor excreción de lípidos en heces, sin embargo, se observa que los grupos tratados con los germinados inducidos con AS, presentan un contenido estadísticamente mayor de lípidos en heces que el resto de los grupos

(Figura 23), lo cual podría sugerir que algunos compuestos presentes en estos podrían tener el potencial de inhibir la absorción intestinal de lípidos.

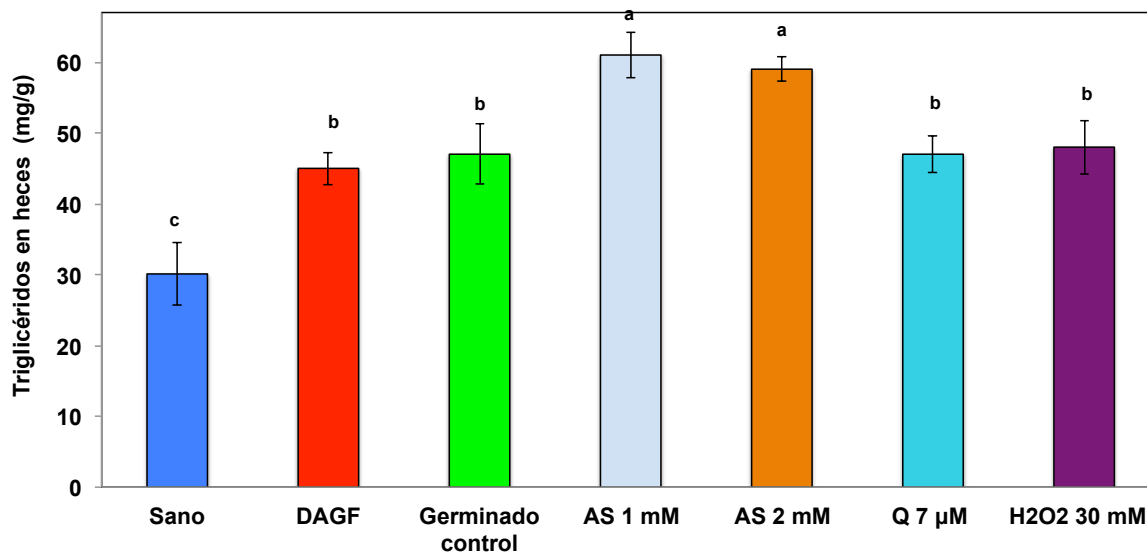


Figura 23. Contenido de triglicéridos en heces de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Debido a lo anterior, se realizó un ensayo de inhibición de la lipasa pancreática, con los germinados (Figura 24). Se puede observar que todos los germinados tienen la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática, siendo mayor este efecto para los germinados inducidos con ácido salicílico los cuales inhiben a la lipasa en porcentajes mayores al 25 %, lo cual apoya la teoría de que las ratas alimentadas con estos germinados, eliminen una mayor cantidad de lípidos en heces.

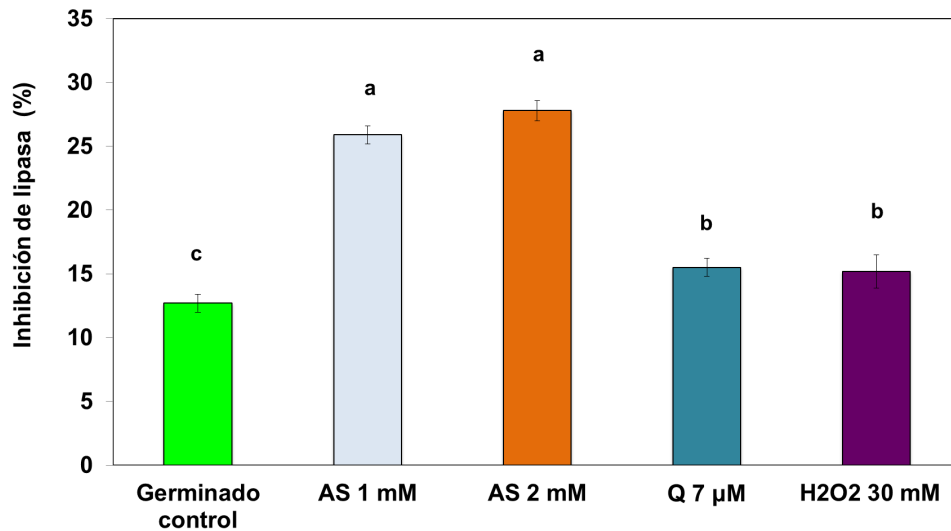


Figura 24. Inhibición *in vitro* de la enzima lipasa pancreática con germinados de frijol. Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Posteriormente, se realizó un análisis de PLS-DA para identificar a los compuestos que tienen una mayor relación con este efecto. En la Figura 25 se muestra el gráfico de los coeficientes de regresión del modelo obtenido por PLSA-DA, se puede observar que la mayoría de los compuestos del perfil presentan la capacidad de inhibir a la enzima, tales como los ácidos fenólicos, protocatecuico, e hidroxibenzoico. Los flavonoides, rutina y hesperidina; así como la saponina soyasaponina I y el campesterol 3β-glocopiranosido.

En relación con los compuestos polifenólicos, hay varios estudios que confirman su actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática (Buchholz y Melzig, 2015). Los polifenoles representan la clase mayoritaria de compuestos que pueden inhibir a esta enzima, ya que tienen la capacidad de unirse a la enzima en diversos sitios polivalentes donde los compuestos polifenólicos puede unirse mediante diversas interacciones químicas (Lunagariya y col., 2014). Por otro lado, las saponinas han demostrado tener un importante poder inhibidor de la enzima, ya que compiten por los sitios de unión de ésta (Marelli y col., 2016; Singh y col., 2015; Lunagariya y col., 2014).

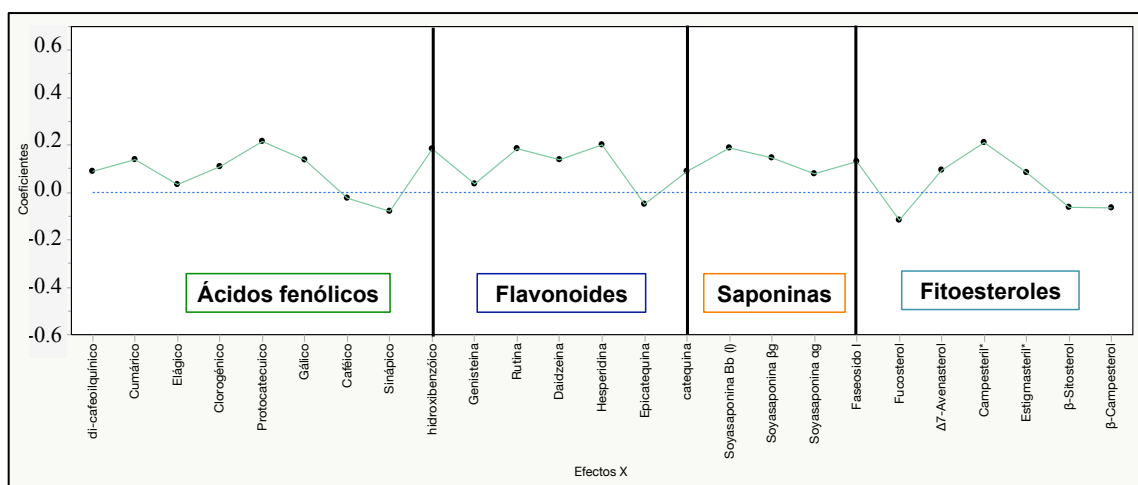


Figura 25. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con la inhibición de la lipasa pancreática.

Los fitoesteroles inhiben la absorción de colesterol a nivel intestinal (Ramírez-Jiménez y col., 2014), sin embargo, no hay información de cómo estos compuestos podrían tener un efecto sobre la actividad de la lipasa pancreática. Sin embargo se sabe que los fitoesteroles se unen a los ácidos biliares impidiendo que estos emulsionen las grasas, lo cual podría hacer menos accesibles a los lípidos, impidiendo de esta manera que la lipasa los hidrolice. De esta manera podría estar ocurriendo una menor absorción de lípidos en el intestino ocasionado parcialmente por el efecto de los fitoesteroles.

7.6.4 Estudio *In silico* de los compuestos fitoquímicos de germinados de FJ *Dalia* relacionados con la inhibición de lipasa pancreática

Actualmente la quimioinformática combina la química computacional, el modelamiento de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), la investigación de datos químicos (bases de búsqueda web) y muchas otras herramientas destinadas a predecir el potencial farmacológico de compuestos bioactivos derivados de plantas. Los compuestos químicos con capacidades

razonables de absorción, distribución, metabolismo y excreción pero con baja toxicidad (ADMET) pueden extraerse de grandes conjuntos de datos de compuestos fitoquímicos, así como y su eficacia biológica *in vitro*, *ex vivo* o *in silico* puede confirmarse adicionalmente. El kit de herramienta WEB de molinspiration proporciona información útil sobre las características moleculares implicadas en ADMET y la semejanza a un fármaco de un fitoquímico particular, utilizando su secuencia SMILE. En este análisis, se evaluaron las seis moléculas principales con actividad anti-lipasa (puntuaciones PLS-DA / VIP de 0,28 a 0,30; tabla 4) (código; CID Pubchem): ácido 4-hidroxibenzoico (OHBA; 135), ácido protocatecuico (PCA; 72) , campesteril-3-β-glucopiranosido (C3BG; 70699334), rutina (RTN; 5280805), hesperidina (HPN; 10621), soyasaponina I (SSI; 122097). Según el Cuadro 15, se identificaron tres subgrupos con características moleculares distintivas como el peso molecular, el coeficiente de partición octanol/agua y las violaciones de la regla de cinco de Lipinski (MW/cLogP/LPV): Grupo A: OHBA, PCA (bajo/moderado/ninguno), Grupo B: C3BG (alto/alto-muy alto/dos) y, Grupo C: RTN, HPN, SSI (alto/bajo-moderado/tres). El mayor MW está de acuerdo con los valores más altos del área de superficie polar topológica (TPSA), donador de enlaces de hidrógeno (HBDC), aceptor de enlaces de hidrógeno (HBAC), enlace rotatable (RBC) y LPV ($r = 0.87-0.95$) pero no con cLogP ($r = 0.03$). En consecuencia, TPSA, HBDC y HBAC se correlacionan directamente con la absorción pasiva de una molécula particular (Ertl y col., 2000) pero LPV, como está influenciado por MW y cLogP, puede cambiar este escenario.

Un alto valor de clogP significa baja hidrofiliidad y poca penetración o absorción y, por lo tanto, los fitoquímicos del grupo C a pesar de tener un TPSA grande podrían absorberse menos que los del grupo A, lo que a su vez ayudaría a mantener su concentración por más tiempo dentro del intestino lumen (Gullón y col., 2017). Además, el número de enlaces giratorios en una molécula particular es una característica importante implicada en todos los cambios conformacionales requeridos para la unión a receptores o canales celulares. En este sentido, la flexibilidad conformacional de las moléculas evaluadas fue mayor para los grupos B

y C en comparación con el grupo A, pero solo C3BG puede actuar como ligando nuclear o como inhibidor enzimático de acuerdo con sus puntuaciones de bioactividad de Molinspiration (0,35, 0,45 respectivamente). Estos resultados indican que todos estos fitoquímicos podrían actuar por diferentes mecanismos, de forma sinérgica, sobre el efecto hipolipidémico o antiobesidad de los germinados de FJ Dalia inducidos con AS, además de actuar como inhibidores potenciales de la lipasa (Pérez-Ramírez y col., 2017; Marelli y col. 2016; Buchholz & Melzig, 2015; Singh y col., 2015; Figueroa-Perez y col., 2015; Lunagariya y coll., 2014).

OHBA y PCA pueden ejercer su efecto epigenético dentro de los enterocitos debido a su mayor absorción (Domínguez-Ávila y col., 2017), mientras que C3BG y SS1 pueden probablemente contribuyen a la solubilidad luminal de micelas de colesterol y / o la inhibición de la expresión génica de las enzimas lipogénicas clave encontradas para las semillas de frijol negro (Chávez-Santoscoy y col., 2013), mientras que RTN, HPN y su fase dos metabolitos pueden atenuar la adipogénesis y varios cambios metabólicos debido a la dieta HFF administrada (Mosqueda-solis, y col., 2016; Panchal y col., 2011; Hsu & Yen, 2008). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar estas hipótesis.

Los estudios de acoplamiento molecular basados en computadora a menudo se usan para evaluar el modo de unión de los ligandos hacia una proteína determinada. La información detallada sobre la naturaleza (por ejemplo, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, etc.) y la fuerza de unión absoluta entre una enzima y un fitoquímico particular, es el punto de partida para diseñar nutracéuticos potentes o específicos para un propósito terapéutico dado (Mohan y col., 2005). La posición preferida del ligando (orientación / conformación molecular) con la menor energía de unión (ΔG_{bind}) se usa a menudo como una función de puntuación para seleccionar el complejo proteína-ligando más verosímil de tal manera que cuanto más negativo sea el ΔG_{bind} , mayor será la probabilidad de enlace. De acuerdo con el Cuadro 15, los cinco fitoquímicos evaluados mostraron valores ΔG_{bind} negativos para su interacción con rPLRP2, siendo los que pertenecen al grupo C los más eficientes (-8.5 a -9.0). Estos valores de ΔG_{bind}

fueron comparables a los reportados entre la lipasa pancreática humana (hPTL, banco de datos de proteínas 1LPB) y ciertos flavonoides del té negro (-8.91 a -10.14) (Mohapatra y col., 2015). RTN (un flavonoide-O-diglicósido) es un inhibidor de lipasa bien estudiado (IC50 57 μM ; Orlistat IC50 0.58 μM) y las características moleculares de los aductos de lipasa pancreática porcina, RTN (interacción π - π con anillo bencénico de Phe-216) han sido reportado recientemente (Tao y col., 2015). Estos datos podrían ser similares para la interacción entre RTN con hPLRP2 e incluso rPLRP2 debido a su alta homología con hPTL (Lowe, 2000). Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay información sobre estudios que involucren PLRP2 (de cualquier especie monogástrica) y HPN o SSI, dos fitoquímicos que son particularmente inducidos por los tratamientos de AS en los germinados de FJ Dalia (Mendoza-Sánchez y col., 2016).

rLIPR2 es una proteína de 1,8 Å (468 aminoácidos) con un dominio globular (N-terminal) y un sandwich- β (C-terminal), que muestra una identidad del 67% con la lipasa de tripsina pancreática de rata (rLIPP). Hidroliza (α / β serina-hidrolasa) TAG (EC 3.1.1.3), fosfolípidos y galactolípidos (EC 3.1.1.26) como LIPR2 de otras especies (Xiao, y col., 2013), requiere activación interfacial mediante agregado (por ejemplo, gotas de aceite, bicapas lipídicas o películas lipídicas monomoleculares) en lugar de sustratos monoméricos alrededor de su dominio de párpado y es inhibida eficazmente por Orlistat (inhibidor covalente) como en el caso de la lipasa pancreática humana (hPTL), pero no parece requerir colipasa ni se inhibe al aumentar la concentración de sal biliar (Aloulou y col., 2006; Roussel, y col., 1998). El sitio activo de hPTL está situado en el fondo de una grieta hidrófoba cubierta por la "tapa" (estiramiento peptídico C238-C262) en su conformación de tapa cerrada que difieren en las posiciones 245, 257 y 258 cuando se compara con rLIPP que presenta una conformación de tapa abierta. Su tríada catalítica (Ser152, His263 y Asp176) incluye el nucleófilo que pertenece a la secuencia consenso habitual GX-(nucleófilo) -XG (Roussel y col., 1998).

Cuadro 15. Informática molecular de los fitoquímicos seleccionados de los germinados de FJ Dalia¹

Parameters	OHBA	PCA	C3BG	RTN	HPN	SSI
Características moleculares						
Peso molecular (g/mol)	138.1	154.1	562.8	610.5	610.6	943.1
coeficiente octanol/porción de agua (cLogP)	1.4	0.9	6.7	-1.1	-0.6	1.7
Área de superficie polar topológica (Å)	57.5	77.8	99.4	269.4	234.3	295.0
Donador de enlace de hidrógeno (#)	2	3	4	10	8	11
Aceptor de enlace de hidrógeno (#)	3	4	6	16	15	18
Enlace rotatable (#)	1	1	8	6	7	9
"regla de las cinco violaciones " de Lipinski(#)	0	0	2	3	3	3
Molecular docking²						
ΔG_{bind} (Ligand- rat lipase; kcal/mol)	-5.8	-6.0	-7.6	-8.6	-8.5	-9.0
Druglikeenes³						
G protein-coupled receptors ligand	-0.98	-0.88	0.15	-0.05	-0.01	-3.24
Ion channel modulator	-0.40	-0.40	-0.20	-0.50	-0.60	-3.70
Kinase inhibitor	-1.21	-1.10	-0.40	-0.14	-0.36	-3.68
Nuclear receptor ligand	-0.62	-0.58	0.35	-0.23	-0.20	-3.52
Protease inhibitor	-1.19	-1.09	0.07	-0.07	0.00	0.06
Enzyme inhibitor	-0.41	-0.34	0.45	0.12	0.06	-3.16

¹Moléculas (código; Pubchem CID): ácido 4-hydroxibenzoico (OHBA; 135), ácido protocatecuico (PCA; 72), campesteril-3- β -glucopiranosido (C3BG; 70699334), rutina (RTN; 5280805), hesperidina (HPN; 10621), soyasaponina I (SSI; 122097); ² ΔG de unión entre el ligando y la lipasa de *Rattus norvegicus* [SWISS-PROT: proteína relacionada con la lipasa pancreática (LIPR2_RAT P54318)]; ³Puntuación de bioactividad (Molinspiration online property calculation toolkit; <http://www.molinspiration.com>).

Cuadro 16. Datos de acoplamiento molecular entre el rPLRP2 y hesperidina o soyasaponina I

Residuo	Distancia (Å)		Unión
	Hesperidina	soyasaponina I	
Asn ₂₂₉	2.67	2.6	Enlace de hidrógeno
		3.8	Hidrofóbico
Glu ₂₃₃		3.1	Enlace de hidrógeno
Cys ₂₃₇	2.32		Enlace de hidrógeno
Tyr ₂₈₀		4.2	Hidrofóbico
Gln ₂₉₂		3.2	Enlace de hidrógeno
Asn ₃₂₈	3.15		Enlace de hidrógeno
Arg ₃₃₇	2.01		Enlace de hidrógeno
	2.25		Enlace de hidrógeno
	2.26		Enlace de hidrógeno
Tyr ₃₆₉	3.78		Hidrofóbico
	3.66		Hidrofóbico
Glu ₃₇₀	2.33		Enlace de hidrógeno
	2.52		Enlace de hidrógeno
Arg ₃₈₄	1.94	2.1	Enlace de hidrógeno
	1.78	2.6	Enlace de hidrógeno
Asp ₃₈₇		3.3	Enlace de hidrógeno

Resumen de los sitios / distancias de unión representados en

La Figura 26 representa los modos de unión entre rPLRP2 y HPN (A, C) o SSI (B, D) y de acuerdo con el Cuadro16, HPN tiene más residuos de unión (n = 12; distancias entre 1,8-3,8 Å) que SSI (n = 8 ; distancias entre 2.1-4.2 Å) fuera de la región del párpado de enlaces de hidrógeno y naturaleza hidrofóbica. Aunque HPN y SSI comparten tres posibles sitios de unión en rPLRP2 en Asn229 y Arg384, difieren en todos los demás sitios de unión, lo que a su vez podría significar que ambos fitoquímicos no establecerán ninguna competencia entre sí cuando estén presentes en una base equimolar. En base a estos datos, y aunque todavía no se han publicado estudios cinéticos, HPN y SSI pueden interferir con el cambio conformacional requerido y la estabilidad de rPLRP2 (inhibición interfacial) en presencia de lípidos y anfífilos (Aloulou y col., 2006)

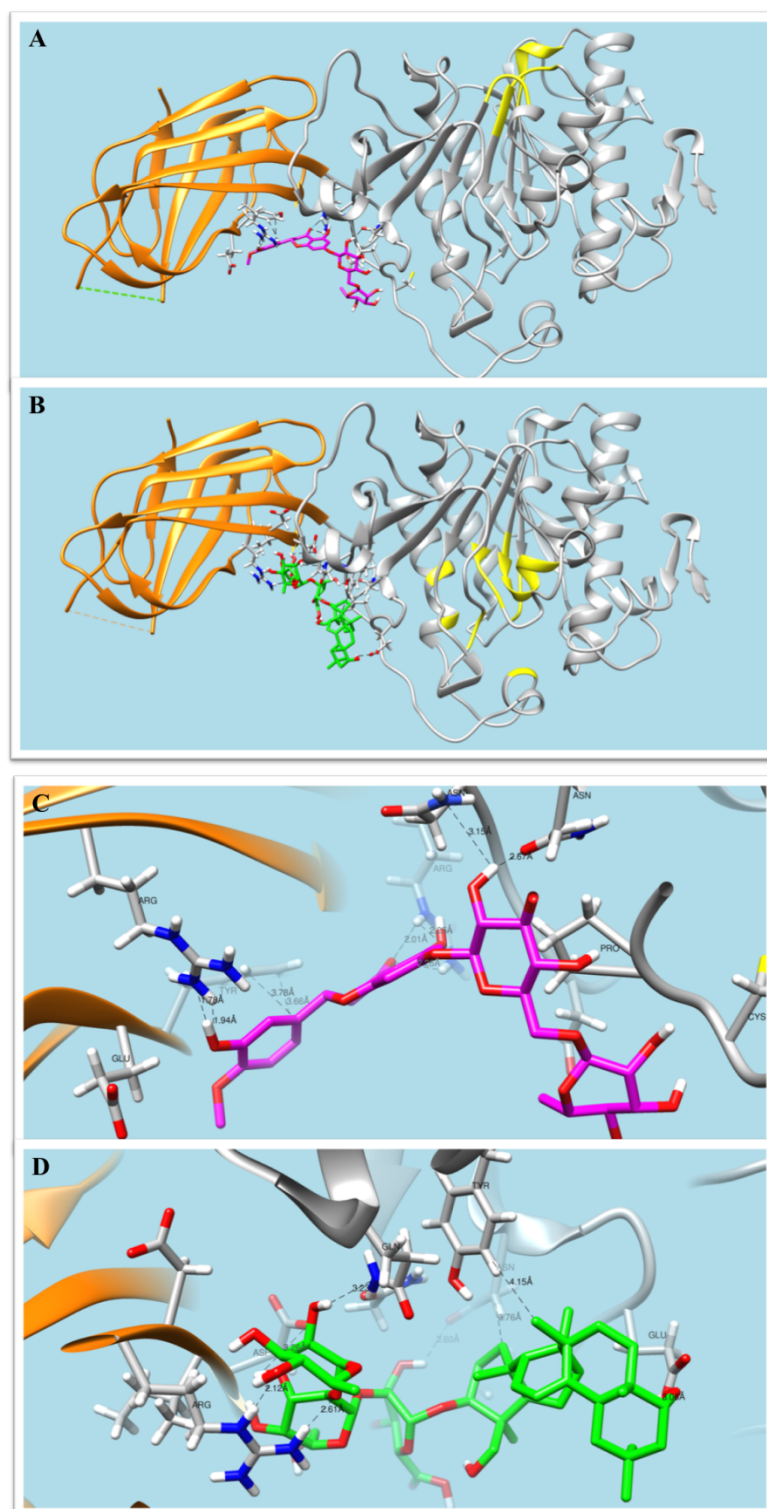


Figura 26. Acoplamiento molecular entre hesperidina (A, C) y soyasaponina I (B, D) con la lipasa pancreática

7.6.5 Efecto del consumo de germinados sobre el contenido de lípidos en hígado y su relación con componentes fitoquímicos

Adicionalmente, se ha reportado que el consumo de dietas con elevado contenido calórico, especialmente proveniente de grasas saturadas y fructosa, inducen efectos metabólicos perjudiciales, que incluyen la acumulación excesiva de grasa en tejido hepático. La infiltración de lípidos y producción de los mismos en el hígado, conlleva a un estado hipertrófico de las células hepáticas, este efecto es conocido como esteatosis hepática (Jansen, 2004; Brunt y col., 1999).

Con la finalidad de evaluar el grado de esteatosis en las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y el efecto que tiene el consumo de germinados de frijol inducidos y sin inducir sobre este padecimiento, se llevó a cabo un análisis de histología en el tejido hepático de los animales. Las micrografías se muestran en la Figura 27. Al comparar el tejido de las ratas sanas con las ratas DAGF se puede observar que el tejido de las ratas DAGF presenta lípidos acumulados en los hepatocitos, que se observan como circunferencias blancas en el tejido, las cuales no están presentes en el tejido de las ratas sanas. El estudio histológico demostró que el grado de esteatosis en estos animales es de 3, en la escala de 0 a 4 de acuerdo a la clasificación de Brunt y col. (1999). Por otro lado, al observar el tejido de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, tratadas con los germinados de frijol AS y Q, se puede observar que es similar al tejido de las ratas sanas, mientras que el germinado control y germinado inducido con H₂O₂ 30 mM, disminuyeron el grado de esteatosis a grado 1, respecto al grupo obeso.

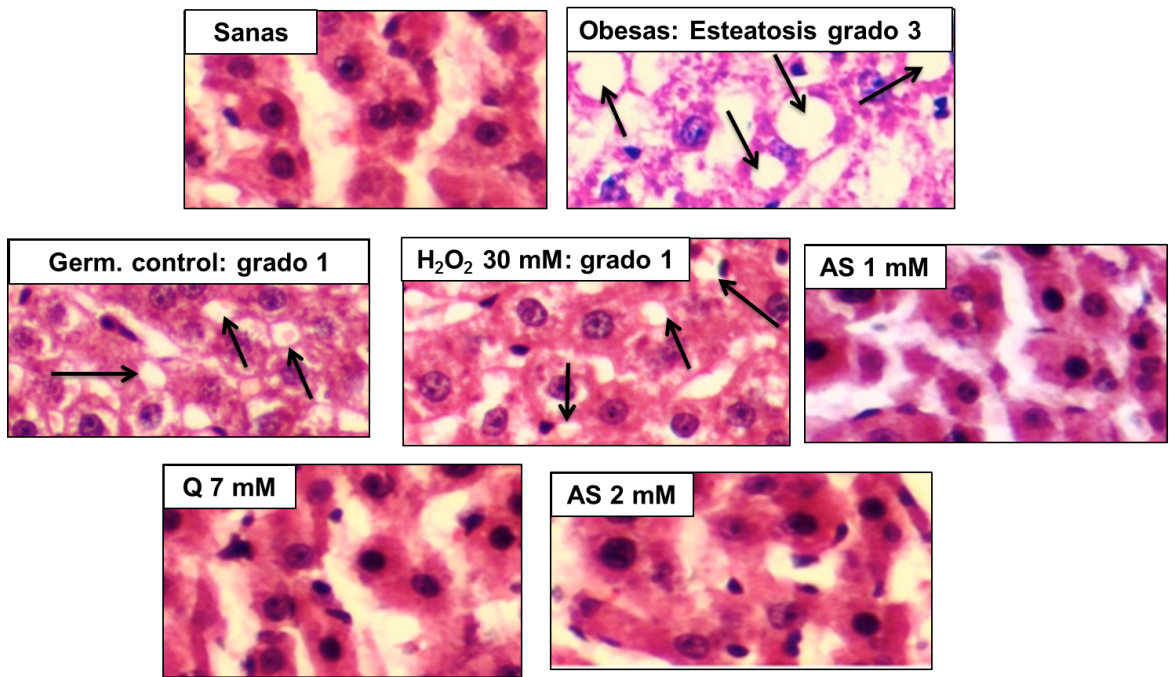


Figura 27. Microfotografías de tejido hepático de los grupos de experimentación. Tinción con hematoxilia y eosina, ampliación 200X. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Adicionalmente al estudio histológico, se cuantificó el contenido de lípidos en el tejido, el cual se muestra en la Figura 28, en la que se observa que el grupo DAGF presenta 63 % más lípidos que el grupo sano. Mientras que, todos los grupos alimentados con dieta alta en grasa y fructosa, tratados con los germinados de frijol, presentaron un menor contenido de lípidos (hasta 48% menos) respecto al grupo DAGF control. Este resultado permite corroborar los resultados del análisis histológico.

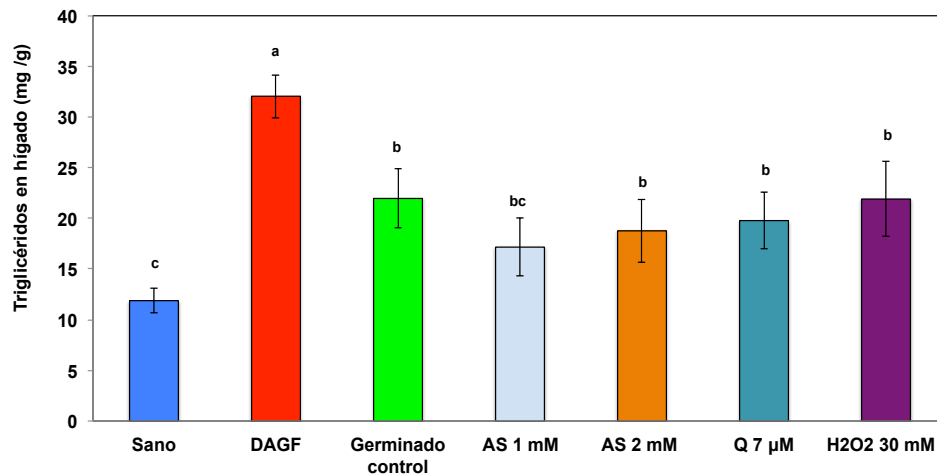


Figura 28. Efecto de los germinados sobre el contenido de triglicéridos en hígado de los animales alimentados con dieta alta en grasa y fructosa. Los valores representan la media \pm D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), con la prueba de Tukey. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

7.6.6 Enzimas de daño hepático

La enzima Aspartato Aminotransferasa (AST) es una enzima intracelular abundante en órganos como el corazón e hígado cuya función es catalizar la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. Su concentración elevada en suero no es específica de un daño hepático pero sugiere un posible daño. Por lo anterior, se cuantificó otra enzima como la Alanino Aminotransferasa (ALT) (Cuadro 16). Esta enzima, tiene la función de transferir reversiblemente un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El aumento de

ALT en suero es más específico e indicativo de un posible daño hepático, pero en conjunto, son un buen indicador de disfunción hepática.

En el Cuadro 17 se pueden observar los niveles de estas dos enzimas en suero. El grupo DAGF presenta un incremento significativo de los dos parámetros cuando es comparado con el grupo sano. Para AST no se observó una disminución significativa en ningún tratamiento, mientras que la actividad de ALT fue menor en todos los animales tratados con los germinados, siendo AS 2 mM similar al control sano.

Se ha relacionado a la obesidad con el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica, y a su vez en esta se ha observado un incremento de enzimas hepáticas de entre las cuales la ALT, ha tenido una mayor relación con este padecimiento. Anteriormente se mencionó un grado de esteatosis 3 en el grupo que consumió la dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) y al observar el nivel de enzimas hepáticas se observa que es el grupo con una concentración mayor de ALT, mientras que los grupos que consumieron germinado, presentaron concentraciones significativamente menores de esta enzima, lo cual corresponde con un menor grado de esteatosis también observado para estos grupos.

Cuadro 17. Enzimas relacionadas con daño hepático de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol.

Grupo	AST	ALT
	(U/L)	(U/L)
Sano	14.0 ± 1b	20.8 ± 3c
DAGF	25.5 ± 2a	41.0 ± 1a
Germinado control	25.1 ± 3a	35.2 ± 1b
AS 1 mM	20.4 ± 4a	30.2 ± 5b
AS 2 mM	21.2 ± 1a	28.2 ± 1bc
Q 7 µM	24.8 ± 3a	32.8 ± 2b
H ₂ O ₂ 30 mM	23.8 ± 3a	38.0 ± 2b

Los valores representan la media ± D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (p<0.05), con la prueba de Tukey. Aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT), Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), Quitosano (Q), ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

7.6.7 Expresión de genes relacionados con los procesos de lipogénesis y beta oxidación en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa y tratadas con germinados de frijol

La esteatosis hepática, caracterizada por una excesiva acumulación de lípidos en el hígado, puede ocurrir como resultado de la síntesis *de novo* ó lipogénesis, que es regulada por el factor de transcripción SRBP-1 (sterol regulatory element binding proteins), mediante la activación de las enzimas lipogénicas, ACC (Acetil CoA Carboxilasa), FAS (Sintasa de ácidos grasos) y SCD-1 (Estearoil CoA desaturasa) (Ye-Huang, 2013). En esta vía lipogénica, se producen ácidos grasos libres, los cuales son esterificados con glicerol y forman triglicéridos que se pueden almacenar en el hígado. Además, otra causa de esteatosis hepática es la inactivación de la oxidación de lípidos por β -oxidación, donde participan de manera importante las enzimas CPT1 (Carnitin Palmitoil Transferasa 1) y ACAD (Acil CoA deshidrogenasas) (McArdle y col., 2013; Postic y Girard; 2008), al estar esta vía parcialmente inactiva, los lípidos que se producen en el hígado y son transportados a este órgano, se almacenan en lugar de ser oxidados.

Se ha reportado que el frijol común tiene importantes efectos hipolipidémicos, y entre los mecanismos citados, se encuentra la inhibición de la vía de lipogénesis y la activación de la β -oxidación en el hígado. Es por esto, que se cuantificó la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos en el hígado, los cuales se muestran en el Cuadro 18.

La expresión de SRBP-1 fue menor un 26 % en el hígado de animales tratados con el germinado control. Mientras que en los animales alimentados con el germinado con AS 2 mM fue 56 % menor. Respecto a FAS el comportamiento en la expresión fue similar a SRBP. En este caso, los animales tratados con el germinado control mostraron una expresión menor hasta en un 48%. Mientras que para el germinado con AS 2 mM la expresión fue menor hasta en un 94 % respecto a los animales del grupo DAGF.

En relación con CPT1, el grupo tratado con el germinado control, presentó mayores niveles de la expresión de este gen hasta en de 93 %, Mientras que en el grupo alimentado con germinado AS 2 mM, la expresión fue estadísticamente similar al germinado control.

Respecto a la expresión de ACAD, solamente el tratamiento con AS 2mM presentó mayor expresión de este gen respecto a los animales alimentados con DAGF (Cuadro 18).

Con estos resultados se puede sugerir que el consumo de germinados en las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, puede inactivar lipogénesis y activar la oxidación de lípidos en hígado, y que este efecto se ve incrementado cuando los germinados fueron tratados químicamente con AS 2 mM.

Cuadro 18. Enzimas del metabolismo lipídico en hígado de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con germinados de frijol.

Grupo	SREBP-1	FAS	CPT1	ACAD
DAGF	4.5 ± 0.50a	4.2 ± 0.56a	0.1 ± 0.03b	0.3 ± 0.04b
Germinado control	3.1 ± 0.11b	2.2 ± 0.46b	1.8 ± 0.98a	0.4 ± 0.01b
AS 2mM	1.8 ± 0.11c	0.2 ± 0.01c	2.8 ± 0.08a	0.8 ± 0.07a

Los datos están expresados como las veces de cambio en relación con el grupo sano. Los valores representan la media ± D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), con la prueba de Tukey. SRBP-1, sterol regulatory element binding proteins, FAS, synthase fatty acid, CPT1, carnitine palmitoyl transferase 1, y ACAD, medium-chain acyl CoA dehydrogenase. Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), ácido salicílico (AS).

Además, con la finalidad de asociar los compuestos relacionados con los efectos antes mencionados, se realizó un análisis de PLS-DA, del cual se obtuvieron los coeficientes de regresión que se muestran en la Figura 29, donde se puede observar que el menor contenido de lípidos en hígado está relacionado con el ácido caféico, los flavonoides genisteína y epicatequina, y los fitoesteroles fucosterol, β -sitosterol y β -campesterol. Se ha reportado que el ácido caféico al igual que la genisteína tienen la capacidad de disminuir la síntesis *de novo* al inhibir a SRBP-1, que es factor de transcripción de las

enzimas lipogénicas ACC y FAS (Liao y col., 2014; Shin y col., 2007). Por otro lado, aunque a la epicatequina no se le ha reportado un efecto directo sobre el metabolismo lipídico en hígado, si se ha reportado que téis ricos en este compuesto, generan un incremento en el catabolismo de lípidos, mediante la activación de la beta oxidación (Murase y col., 2002).

Chavez-Santoscoy y col. (2013) reportaron que los fitoesteroles del frijol disminuyen la actividad de enzimas lipogénicas y activan la actividad de enzimas de beta oxidación, lo cual contribuye a la reducción de triglicéridos en sangre.

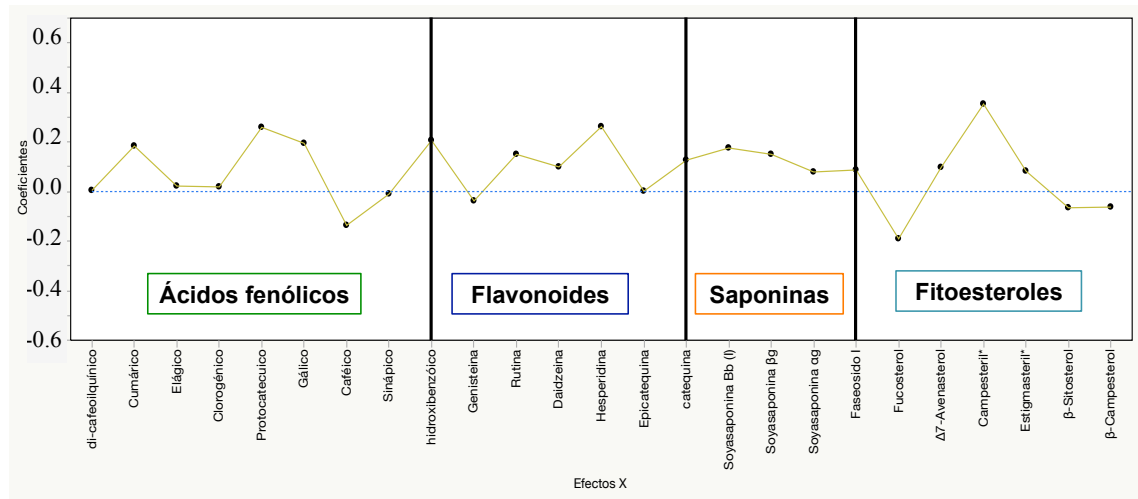


Figura 29. PLS-DA de los compuestos fitoquímicos de germinados con y sin inducción química, y su relación con el contenido de lípidos en hígado.

VIII. CONCLUSIONES

- Las condiciones de temperatura y humedad más altas presentaron una sinergia para el proceso de germinación.
- Los tres inductores, AS, Q y H₂O₂, aceleraron el desarrollo de plántulas de frijol a las condiciones de humedad y temperatura de experimentación.
- El peróxido de hidrógeno y ácido salicílico al tercer día indujeron un porcentaje de germinación similar al control e incrementaron la longitud de la radícula, lo que sugiere cambios en el metabolismo de los germinados.
- La germinación e inducción química incrementó compuestos fitoquímicos y disminuyó compuestos antinutricios.
- El efecto sobre el peso corporal fue controlado por todos los grupos alimentados con germinados, y este efecto está relacionado con los compuestos ácido gálico y sinápico, la saponina faseosido I y los fitoesteroles β-sitosterol y β-campesterol. Sin embargo los grupos alimentados con el germinado control e inducido con H₂O₂, presentaron pesos menores al grupo sano, dicho efecto puede estar dado por su contenido de compuestos antinutricios.
- El consumo de germinados de frijol disminuyó los lípidos en sangre de los animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa, y este efecto no mejoró con germinados tratados químicamente. La disminución de los lípidos en sangre está relacionada con la inhibición de su absorción intestinal y dicho efecto se asoció con el ácido protocatecuico, ácido hidroxibenzoico, rutina, hesperidina, faseosido I y el campesterol 3β-glocopiranosido.
- Los compuestos a los que se les atribuye la inhibición de la absorción intestinal de lípidos, de acuerdo al análisis estadístico PLS-DA son ácido protocatecuico, ácido hidroxibenzoico, rutina, hesperidina, soyasaponina I y el campesterol 3β-glocopiranosido, y este efecto fue corroborado con el análisis *in silico*
- Además el consumo de germinados reguló el nivel de lípidos mediante la activación de la beta oxidación e inactivación de lipogénesis, donde los

compuestos relacionados con estos efectos fueron el ácido cafeico, los flavonoides genisteína y epicatequina, y los fitosteroles fucosterol, β -sitosterol y β -campesterol.

- La germinación del FJ Dalia es una opción para mejorar los beneficios de esta leguminosa, con efectos poco significativos al emplear la inducción química con AS, Q y H₂O₂

IX. REFERENCIAS

1. Aissaoui, A., Zizi, S., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2011). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Coriandrum sativum* L. in *Meriones shawi* rats. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 652-661.
2. Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., & Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(9), 995-1013.
3. Anaya, F., Fghire, R., Wahbi, S., & Loutfi, K. (2015). Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* In press.
4. Angelova, Z., Georgiev, S., & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(2), 72-83.
5. Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Rajab, A., Asghari, G., & Azizi, F. (2012). Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes research and clinical practice*, 96(3), 348-354.
6. Bednarek, P., & Osbourn, A. (2009). Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science*, 324(5928), 746-748. Besnier Romero, F. (1989). Semillas. *Biología y Tecnología*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 637 p.
7. Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240.

8. Besnier Romero, F. (1989). Semillas. Biología y Tecnología. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 637 p.
9. Botha, F. C., Potgieter, G. P., & Botha, A. M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 211-224.
10. Bradford, K.J., Nonogaki, H. (2007). Seed development, dormancy and germination. First edition. Oxford, Blackwell publishing. 224-247.
11. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
12. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Bacon, B. R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*, 94(9), 2467-2474.
13. Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta medica*, 81(10), 771-783.
14. Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30.
15. Çavusoglu, K., & Kabar, K. (2010). Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4.

16. Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2013). Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant foods for human nutrition*, 68(4), 416-423.
17. Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Urbe, J. A., Granados, O., Torre-Villalvazo, I., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., ... & Tovar, A. R. (2014). Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *British journal of nutrition*, 112(6), 886-899.
18. Cicero, A. F., & Colletti, A. (2015). Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: The available clinical data. *Phytomedicine*.
19. Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
20. Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1987). Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science*, 52(2), 332-334.
21. Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
22. Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2045-2052.

23. Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.
24. Doan, K. V., Ko, C. M., Kinyua, A. W., Yang, D. J., Choi, Y. H., Oh, I. Y., ... & Jung, M. H. (2014). Gallic acid regulates body weight and glucose homeostasis through AMPK activation. *Endocrinology*, 156(1), 157-168.
25. Doria, E., Campion, B., Sparvoli, F., Tava, A., & Nielsen, E. (2012). Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 72–80.
26. Dueñas, M., Sarmiento, T., Aguilera, Y., Benitez, V., Mollá, E., Esteban, R. M., & Martín- Cabrejas, M. A. (2016). Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT – Food Science and Technology*, 66, 72–78.
27. Fantini, N., Cabras, C., Lobina, C., Colombo, G., Gessa, G. L., Riva, A., ... & Carai, M. A. (2009). Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 9316-9323.
28. Figueroa-Pérez, M. G., Gallegos-Corona, M. A., Ramos-Gomez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Salicylic acid elicitation during cultivation of the peppermint plant improves anti-diabetic effects of its infusions. *Food & function*, 6(6), 1865-1874.
29. Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E. S., & Kastelein, J. J. (2011). Obesity

and dyslipidemia. *Medical Clinics of North America*, 95(5), 893-902.

30. Gharib, F. A., & Hegazi, A. Z. (2010). Salicylic acid ameliorates germination, seedling growth, phytohormone and enzymes activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under cold stress. *Journal of American Science*, 6(10), 675-683.
31. Grant, G., More, L. J., McKenzie, N. H., Stewart, J. C., & Puzstai, A. (1983). A survey of the nutritional and haemagglutination properties of legume seeds generally available in the UK. *The British Journal of Nutrition*, 50(2), 207–214.
32. Gruz, J., Novák, O., & Strnad, M. (2008). Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 111(3), 789–794.
33. Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012a). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food chemistry*, 134(3), 1312-1319.
34. Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012b). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food chemistry*, 134(3), 1312-1319.
35. Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 220-235.
36. Habibi, A., y Abdoli, M. (2013). Influence of salicylic acid pre-treatment on germination, vigor and growth parameters of garden cress (*Lepidium sativum*) seedlings under water potential loss at salinity stress. *Int. Res. J. Appl. Basic*

Sci, 4(6), 1393-1399.

37. Han, K. H., Fukushima, M., Shimizu, K., Kojima, M., Ohba, K., Tanaka, A., ... & Nakano, M. (2003). Resistant starches of beans reduce the serum cholesterol concentration in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 49(4), 281-286.
38. Han, K., Iijuka, M., Shimada, K.-i., Sekikawa, M., Kuramochi, K., Ohba, K., et al. (2005). Adzuki resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*. 94, 902-908.
39. Hartmann, H. T. K. (1971). *Propagación de plantas: principios y prácticas* (No. Sirsi) a376511).
40. Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, 99(3), 464–469.
41. Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 53-61.
42. Jahangir, M., Abdel-Farid, I. B., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 23-33.
43. Janda, M., & Ruelland, E. (2014). Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 117–128.

44. Jansen, P. L. (2004). Non-alcoholic steatohepatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(11), 1079-1085.
45. Jeffery, E. H., & Araya, M. (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 283-298.
46. Jellinger, P., Smith, D., Mehta, A., Ganda, O., Handelsman, Y., Rodbard, H., ... & Seibel, J. (2012). American Association of Clinical Endocrinologists' guidelines for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis. *Endocrine Practice*.
47. 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 Chem*, 51(3), 376-382.
48. Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN pharmacology*, 2014.
49. Khan, W., Prithviraj, B., & Smith, D. L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160(8), 859–863.
50. Kolovou, G. D., Anagnostopoulou, K. K., & Cokkinos, D. V. (2005). Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. *Postgraduate medical journal*, 81(956), 358-366.
51. Koo, S. I., & Noh, S. K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(3), 179-183.

52. Kurosaki, F. (2012). Induction and activation of plant secondary metabolism by external stimuli. In *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. InTech.
53. Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, 53(6), 482-491.
54. Latimer, G. W. (2012). *Official methods of analysis of AOAC International* (No. 543/L357). AOAC international.
55. Liao, C. C., Ou, T. T., Huang, H. P., & Wang, C. J. (2014). The inhibition of oleic acid induced hepatic lipogenesis and the promotion of lipolysis by caffeic acid via up-regulation of AMP-activated kinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1154-1162.
56. 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(2), 328-334.
57. Lin, P. Y., & Lai, H. M. (2006). Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3807–3814.
58. Lombardo, Y. B., Oliva, M. E., Selenscig, D., & Chicco, A. (2011). Effect of Dietary Soybean (*Glycine max* L.) Protein on Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity in an Experimental Model of Dyslipidemia and Insulin Resistance. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 1053-1061).
59. Lopez-Amoros, M. L., Hernandez, T. y Estrella, I. (2006). Effect on germination of legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition Analysis*, 19(4), 277–283.

60. López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., ... & Carretero, M. E. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138(1), 547-555.
61. Lowe, M. E. (2000). Properties and function of pancreatic lipase related protein 2. *Biochimie*, 82(11), 997-1004.
62. Lunagariya, N. A., Patel, N. K., Jagta p, S. C., & Bhutani, K. K. (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI journal*, 13, 897.
63. Ma, Y., Zhao, Y., Walker, R. K., & Berkowitz, G. A. (2013). Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca²⁺ signal. *Plant physiology*, 163(3), 1459-1471.
64. Marrelli, M., Conforti, F., Araniti, F., & Statti, G. A. (2016). Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in the Treatment of Obesity. *Molecules*, 21(10), 1404.
65. Marton, M., Mandoki, Z., Csapo-Kiss, Z., & Csapo, J. (2010). The role of sprouts in human nutrition. A review. *Acta Univ. Sapientiae*, 3, 81-117.
66. Mbithi, S., Van Camp, J., Rodriguez, R., & Huyghebaert, A. (2001). Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *European Food Research and Technology*, 212(2), 188-191.

67. McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, E. M., McMorrow, M., Roche, H. M. (2013). Mechanism of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 54:1-23.
68. McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115(1), 193-199.
69. Mendoza-Sánchez, M., Guevara-González, R. G., Castaño-Tostado, E., Mercado-Silva, E. M., Acosta-Gallegos, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., & Reynoso-Camacho, R. (2016). Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food chemistry*, 212, 128-137.
70. Mohamed, S. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*, 35(2), 114-128.
71. Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., & DesJarlais, R. L. (2005). Docking: successes and challenges. *Current pharmaceutical design*, 11(3), 323-333.
72. Mohapatra, S., Prasad, A., Haque, F., Ray, S., De, B., & Ray, S. S. (2015). In silico investigation of black tea components on α -amylase, α -glucosidase and lipase.
73. Mosqueda-solis, A., Lasa, A., Eseberri, I., Gómez-zorita, S., Pico, C., & Portillo, M. P. (2016). Effects of pterostilbene and hesperidin on adipogenesis in 3t3-l1 cells. *Obesity Reviews*, 17, 18.

74. Munguía-Miranda, C., Sánchez-Barrera, R. G., Hernández-Saavedra, D., & Cruz-López, M. (2008). Prevalencia de dislipidemias en una población de sujetos en apariencia sanos y su relación con la resistencia a la insulina. *salud pública de méxico*, 50(5), 375-382.
75. Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2002). Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *International journal of obesity*, 26(11), 1459.
76. Nilsson, A., Johansson, E., Ekström, L., & Björck, I. (2013). Effects of a brown beans evening meal on metabolic risk markers and appetite regulating hormones at a subsequent standardized breakfast: a randomized cross-over study. *PLoS One*, 8(4), e59985.
77. Nonogaki, H. (2008). Seed germination and reserve mobilization. *eLS*.
78. Okubo, K., & Yoshiki, Y. (2000). The role of triterpenoid on reactive oxygen scavenging system: approach from the new chemiluminescence system (XYZ system). *BioFactors*, 13(1-4), 219-223.
79. Ostlund Jr, R. E. (2004). Phytosterols and cholesterol metabolism. *Current opinion in lipidology*, 15(1), 37-41.
80. Panchal, S. K., Poudyal, H., Arumugam, T. V., & Brown, L. (2011). Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *The Journal of nutrition*, 141(6), 1062-1069.
81. Paucar-Menacho, L. M., Berhow, M. A., Mandarino, J. M. G., Chang, Y. K., & De Mejia, E. G. (2010). Effect of time and temperature on bioactive compounds

in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Research International*, 43(7), 1856-1865.

82. Perez-Aguilar, F. (2005). Etiopatogenia de la esteatohepatitis no alcoholica. *Gastroenterología y hepatología*, 28(7), 396-406.
83. Postic, C. and Girard J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(3):829-838.
84. Queiroz-Monici, K., Costa, G. D., da Silva, N., Reis, S. M., & Oliveira, A. C. (2005). Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starchh from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*. 21 (5), 602-608.
85. Ramasamy, I. (2016). Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clinica Chimica Acta*, 454, 143-185.
86. Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Tejero, M. E., León-Galván, F., & Loarca-Piña, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International*, 76(P1), 92–104.
87. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
88. Reddy, N. R., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research*, 28(1), 92.
89. Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*,

62(10), 3321–3338.

90. Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 5, 17.
91. Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1-15.
92. Roussel, A., Yang, Y., Ferrato, F., Verger, R., Cambillau, C., & Lowe, M. (1998). Structure and activity of rat pancreatic lipase-related protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 32121-32128.
93. Russell, J. C., & Proctor, S. D. (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, 15(6), 318-330.
94. Sahebkar, A., Serban, M. C., Gluba-Brzózka, A., Mikhailidis, D. P., Cicero, A. F., Rysz, J., & Banach, M. (2016). Lipid-Modifying Effects of Nutraceuticals: An Evidence-Based Approach. *Nutrition*.
95. Sánchez-Muniz, F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1), 31-45.
96. Sangronis, E., & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 116-120.

97. Sangronis, E., Rodríguez, M., Cava, R., & Torres, A. (2006). Protein quality of germinated *Phaseolus vulgaris*. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 144.
98. Selvaraj, P., & Pugalendi, K. V. (2012). Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. *Experimental and toxicologic pathology*, 64(5), 449-452.
99. Sharma, A., & Sehgal, S. (1992). Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (*Vicia faba*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 42(2), 127–133.
100. Shimelis, E. A., & Rakshit, S. K. (2007). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry*, 103(1), 161-172.
101. Shin, E. S., Lee, H. H., Cho, S. Y., Park, H. W., Lee, S. J., & Lee, T. R. (2007). Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *The Journal of nutrition*, 137(5), 1127-1131.
102. Singh, G., Suresh, S., Bayineni, V. K., & Kadeppagari, R. K. (2015). LIPASE INHIBITORS FROM PLANTS AND THEIR MEDICAL APPLICATIONS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(13), 1-5.
103. Sirtori, C. R., Galli, C., Anderson, J. W., & Arnoldi, A. (2009). Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, 203(1), 8-17.
104. Spadafranca, A., Rinelli, S., Riva, A., Morazzoni, P., Magni, P., Bertoli, S., et al. (2013). *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite

control. *British Journal of Nutrition*. 109, 1789-1795.

105. Stoeckman, A. K., & Towle, H. C. (2002). The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27029-27035.
106. Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-Martínez, R. A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J. E., de la Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. *CyTA-Journal of Food*, 14(1), 131-137.
107. Sudeep, H. V., Venkatakrishna, K., Patel, D., & Shyamprasad, K. (2016). Biomechanism of chlorogenic acid complex mediated plasma free fatty acid metabolism in rat liver. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 274.
108. Świeca, M., Baraniak, B., & Gawlik-Dziki, U. (2013). In vitro digestibility and starch content, predicted glycemic index and potential in vitro antidiabetic effect of lentil sprouts obtained by different germination techniques. *Food Chemistry*, 138 (2–3), 1414–1420.
109. Tao, Y., Cai, H., Li, W., & Cai, B. (2015). Ultrafiltration coupled with high-performance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for screening lipase binders from different extracts of *Dendrobium officinale*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(20), 6081-6093.
110. Tapsell, L. C. (2004). Diet and metabolic syndrome: where does resistant starch fit in?. *Journal of AOAC International*, 87(3), 756-760.

111. Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 269-282.
112. Troyo-Barriga, P. (2004). Obesidad y dislipidemias. *Gac Méd Méx*, 140.
113. Varady, K. A., & Jones, P. J. (2005). Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels?. *The Journal of nutrition*, 135(8), 1829-1835.
114. Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sierra, I., Blazquez, I., Lambein, F., & Kuo, Y. H. (2002). New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215(6), 472-477.
115. Weston, L. A. (2003). Root exudates: an overview. In *Root ecology* (pp. 235-255). Springer Berlin Heidelberg.
116. Xiao, X., Ross, L. E., Sevilla, W. A., Wang, Y., & Lowe, M. E. (2013). Porcine pancreatic lipase related protein 2 has high triglyceride lipase activity in the absence of colipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(9), 1435-1441.
117. Yoon, S. A., Kang, S. I., Shin, H. S., Kang, S. W., Kim, J. H., Ko, H. C., & Kim, S. J. (2013). p-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(4), 553-557.
118. Zhang, L., Wang, Y., & Yu, D.-Q. (2015). Simultaneous quantification of six major triterpenoid saponins in *Schefflera kwangsiensis* using high-performance liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Natural Product Research*, 29(14), 1350–1357.

119. Zhu, Z., Jiang, W., & Thompson, H. J. (2012). Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S66-S73.
120. Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G., & Zechner, R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 494-500.