



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología  
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

**Bioprocesamiento de Garbanzo Desi  
(*Cicer arietinum* L) para Incrementar  
Potenciales Antioxidante / Inhibición  
de Proliferación de Células  
de Cáncer de Mama**

**T E S I S**

que presenta

**MC Dulce María Domínguez Arispuro**  
como requisito para  
obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en  
Biotecnología de Alimentos**

**Director de Tesis**  
**Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno**  
**Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez**

**Culiacán Rosales, Sinaloa, México**

**Junio 2017**

## INDICE GENERAL

	Pág
INDICE GENERAL	I
INDICE DE CUADROS	li
ÍNDICE DE FIGURAS	lii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	4
III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
A ESTRÉS OXIDATIVO	7
1 Estrés oxidativo	7
2 Radicales libres	7
3 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	7
4 Daños por ROS a biomoléculas	8
a Lípidos	8
b Proteínas	9
c Ácido desoxiribonucleico (ADN)	9
B INFLAMACIÓN Y CÁNCER	10
1 Tipos de inflamación	10
2 Bases moleculares de la inflamación	11
3 Bases moleculares del cáncer	13
a Factor de crecimiento independiente	15
b Insensibilidad a las señales anticrecimiento	17
c Resistencia a muerte celular programada o apoptosis	18
d Angiogénesis sostenida	20
e Inmortalidad celular	20
f Invasión y metástasis	21
4 Genes del cáncer	21
C CÁNCER DE MAMA	23
1 Epidemiología	23
2 Tipos de neoplasias mamarias	23
3 Clasificación molecular del cáncer de mama	24
a Línea celular MDAMB231	25
D RELACIÓN ENTRE DIETA Y CÁNCER	26
1 Alimentos funcionales	28
2 Nutraceuticos	29
3 Actividad antioxidante	32
a Evaluación de la actividad antioxidante	37
b Actividad antioxidante celular	40
E LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA	41
1 Importancia	41
2 Procesamiento de leguminosas	41
a Remojo	41
b Cocción	42

c	Extrusión	43
3	Germinación de leguminosas	44
a	Factores que afectan la germinación	45
1)	Temperatura / tiempo / iluminación	45
2)	Hormonas	46
3)	Metales	47
4	Etapas de la germinación	47
a	Imbibición	48
b	Reanudación del metabolismo y reparación celular	50
c	Síntesis de proteínas	52
d	Metabolismo de hormonas	54
e	Cambios en el embrión	55
f	Relación entre el embrión y la estructura circundante	55
5	Efecto de la germinación de leguminosas sobre composición química y valor nutricional	56
6	Efecto de la germinación de leguminosas sobre fitoquímicos y propiedades nutraceuticas	57
F	IMPORTANCIA DEL GARBANZO EN LA ALIMENTACION	61
1	Generalidades	61
2	Composición química	62
a	Proteínas	62
b	Lípidos	64
c	Carbohidratos	65
d	Vitaminas y minerales	65
3	Valor nutricional	67
4	Fitoquímicos	69
a	Compuestos fenólicos	69
b	Saponinas	74
c	Oligosacáridos	76
d	Ácidos grasos	77
5	Propiedades nutraceuticas del garbanzo	78
H	GERMINACIÓN DE GARBANZO	79
1	Condiciones para la germinación	80
2	Efecto de la germinación de garbanzo sobre composición química y valor nutricional	81
a	Composición química	81
b	Valor nutricional	82
3	Efecto de la germinación de garbanzo sobre fitoquímicos y propiedades nutraceuticas	85
a	Fitoquímicos	85
b	Propiedades nutraceuticas	86
IV	JUSTIFICACIÓN	90
V	OBJETIVOS	91
A	OBJETIVO GENERAL	91
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	91

VI	MATERIALES Y MÉTODOS	92
	A MATERIALES	92
	B MÉTODOS	92
	1 Obtención de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB)	92
	2 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y actividad antioxidante (AAox) en harinas de garbanzo bioprocesado (HGB)	94
	a Extracción de fitoquímicos libres	94
	b Extracción de fitoquímicos ligados	94
	c Compuestos fenólicos totales (CFT)	95
	d Flavonoides totales (FT)	95
	e Actividad antioxidante (AAox) hidrofílica total	96
	3 Optimización del proceso de germinación del grano de garbanzo	97
	a Diseño experimental	97
	b Optimización del proceso de geminación	99
	4 Composición química de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	99
	a Proteína cruda	99
	b Grasa cruda	100
	c Minerales	100
	d Carbohidratos	100
	e Fibra dietaria total	100
	5 Contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	101
	a Taninos condensados (TC)	101
	b Saponinas	102
	c Actividad antioxidante (ORAC, ABTS)	103
	d Perfil de ácidos fenólicos	103
	6 Actividad antioxidante celular con células de carcinoma hepatocelular (HepG2)	104
	a Cultivo celular	104
	b Ensayo de citotoxicidad	104
	c Actividad antioxidante celular (AAOX <sub>celular</sub> )	105
	d Cuantificación y determinación de EC <sub>50</sub>	106
	7 Actividad anticarcinogénica en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB231)	107
	a Cultivo celular	107
	b Evaluación del efecto citotóxico sobre morfología celular	107
	c Ensayo de inhibición de proliferación celular	108
	d Determinación de apoptosis mediante Anexina V-FITC/IP	108
	8 Análisis estadístico	108
VII	RESULTADOS	110
	A MODELOS DE PREDICCIÓN PARA CONTENIDO DE	110

	COMPUESTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
B	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE GERMINACIÓN	110
C	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO OPTIMIZADA (HGBO)	114
D	CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO OPTIMIZADA (HGBO)	116
	1 Taninos	116
	2 saponinas	117
	3 Compuestos fenólicos totales	117
	4 Flavonoides totales	118
	5 Ácidos fenólicos	118
	6 Actividad antioxidante (ORAC, ABTS)	120
E	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR	122
F	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA	128
	1 Daño morfológico en células de cáncer de mama	128
	2 Inhibición de proliferación de células de cáncer de mama	129
	3 Apoptosis	136
VIII	CONCLUSIONES	144
IX	BIBLIOGRAFIA	146
	Abreviaturas	181

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Compuestos nutracéuticos agrupados por mecanismo de acción	34
2	Clasificación de antioxidantes según su sitio de acción	35
3	Clasificación de antioxidantes según su origen	36
4	Efecto germinación leguminosas sobre contenido de fitoquímicos	58
5	Composición de química del grano de garbanzo	63
6	Aminoácidos esenciales en granos de garbanzo	68
7	Fitoquímicos en granos de garbanzo	70
8	Contenido de isoflavonas en garbanzo	75
9	Efecto de la germinación de garbanzo sobre composición química	83
10	Efecto de la germinación de garbanzo y otras leguminosas sobre el contenido de isoflavonas	87
11	Efecto de la germinación de garbanzo sobre actividad antioxidante	89
12	Diseño experimental utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura de germinación / tiempo de germinación para producir harinas de garbanzo germinado	93
13	Diseño experimental <sup>a</sup> utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura / tiempo de germinación para producir harinas de garbanzo germinado.	111
14	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de modelos de segundo orden, mostrando la relación entre las variables de respuesta ( $Y_k$ ) y variables de proceso (X)	112
15	Composición química, contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de harina de garbanzo bioprocesado optimizada ( <b>HGBO</b> )	115
16	Efecto de la germinación sobre el contenido de ácidos fenólicos de garbanzo desi	119
17	Actividad antioxidante celular y concentración efectiva media de extractos de harinas de garbanzo desi, crudo y bioprocesado (con lavado PBS)	124
18	Actividad antioxidante celular y concentración efectiva media de extractos de harinas de garbanzo desi, crudo y bioprocesado (sin lavado PBS)	126
19	19a. Efecto de los extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> sobre la viabilidad de células de cáncer de mama MDAMB231	132
	19b. Efecto de los extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> sobre la viabilidad de células NIH3T3	132
20	Actividad antiproliferativa de extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> , datos expresados como <b>IC<sub>50</sub></b>	139

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Inflamación y tumorigénesis	12
2	Cadena inflamatoria y cáncer	14
3	Sellos distintivos del cáncer	16
4	Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis	19
5	Objetivo molecular de agentes dietarios	27
6	Esquema organizacional de nutraceuticos	33
7	Eventos físicos y metabólicos durante la germinación	49
8	Estructura común de los compuestos fenólicos	71
9	Graficas de contorno y de optimización gráfica del bioproceso	113
10	Cromatogramas de perfil de ácidos fenólicos	121
11	Efecto de los extractos de <b>HGBO</b> y <b>HGIC</b> sobre la morfología de células de cáncer de mama	129
12	Efecto de diferentes concentraciones de extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> sobre la viabilidad de células MDAMB 231	133
13	Efecto de cisplatino y de diferentes concentraciones de extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> sobre viabilidad de células MDAMB231	135
14	Efecto de cisplatino y de diferentes concentraciones de extractos de <b>HGIC</b> y <b>HGBO</b> sobre viabilidad de células NIH3T3	135
15	<b>IC<sub>50</sub></b> de <b>HGBO</b> y <b>HGIC</b> para inhibir proliferación de células MDAMB231	137
16	<b>IC<sub>50</sub></b> de <b>HGBO</b> y <b>HGIC</b> para inhibir células NIH3T3	138
17	% de inducción de apoptosis de células MDAMB231	140
18	% de apoptosis temprana y tardía de células MDAMB231	142
19	% de apoptosis temprana y tardía de células NIH3T3	143

## I RESUMEN

Las leguminosas germinadas son consideradas alimentos saludables ya que, además del aporte nutricional, son una fuente importante de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados para reducir la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas. El propósito de la presente investigación fue conocer las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de germinación (**TG/tG**) para maximizar los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales (**CFT, FT**) y actividad antioxidante (**AAox**) de semillas de garbanzo desi. La metodología de superficie de respuesta se utilizó como herramienta de optimización. Se utilizó un diseño experimental central rotatable con dos factores [Temperatura de germinación (TG), tiempo de germinación (tG)] y cinco niveles (13 tratamientos). Los germinados provenientes de cada uno de los 13 tratamientos se liofilizaron, atemperaron y molturaron para obtener harinas de garbanzo bioprocesado (**HGB**). Se efectuó análisis de regresión para obtener modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta en función de las variables de proceso. La combinación óptima de variables de proceso para obtener los máximos valores de **CFT, FT** y **AAox** fue **TG=34°C/tG=171 h**. La aplicación de estas condiciones óptimas de germinación permitió obtener harina de garbanzo bioprocesado optimizada (**HGBO**) con valores mayores de contenido de proteína, fibra dietaria, **CFT, FT** y **AAox** que la harina de garbanzo integral crudo (**HGIC**). La germinación de garbanzo desi en condiciones óptimas incrementó significativamente los niveles de ácidos fenólicos: Cumárico, Ferúlico, Sinápico, Elágico y Siríngico. El proceso de germinación en condiciones optimizadas incrementó la actividad antioxidante celular (**AAox<sub>celular</sub>**) de las fracciones libres de garbanzo desi; las fracciones de **HGBO** presentaron valores mayores de **AAox<sub>celular</sub>** que las de **HGIC** (222.2 - 788.3 vs 41.21- 137.22  $\mu\text{M}$  EQ/100 g muestra). Los extractos de **HGBO** y de **HGIC** mostraron inhibición de proliferación de células de cáncer de mama, de 9-53 % y 2.7-28%, respectivamente. La concentración inhibitoria del crecimiento celular (**IC<sub>50</sub>**) fue de 3.4 y 52.7 mg/ml para extractos de **HGBO** y **HGIC**, respectivamente.



Los porcentajes de células de cáncer de mama apoptóticas para extractos de **HGBO** y **HGIC** fueron de 54% y 41%, respectivamente.

La germinación de garbanzo desi, llevada a cabo en condiciones óptimas, mejora el valor nutracéutico de la semilla. La **HGBO** y/o sus extractos pueden ser utilizados como ingrediente / alimento funcional para la prevención de enfermedades crónico degenerativas debido a su potencial antioxidante y anticarcinogénico; pueden recomendarse su utilización como fuente de compuestos bioactivos naturales en alimentos funcionales.

**Palabras clave:** Garbanzo desi, germinación, actividad antioxidante, ácidos fenólicos

## ABSTRACT

Legume sprouts are considered natural, healthy products that provide a source of bioactive compounds to fight against chronic diseases. This study aims to identify the optimal germination temperature and time to maximize total phenolic and flavonoid contents (**TPC**, **FC**), and antioxidant activity (**AoxA**) of desi chickpea. Response surface methodology was used as an optimization tool. An experimental design with two factors [germination temperature (**GT**); germination time (**Gt**)] and five levels was used (13 treatments). The sprouts from each treatment were lyophilized, tempered, and milled to obtain germinated chickpea flours (**GCF**). For the prediction of the composition of phytochemicals and **AoxA** in **GCF**, we conducted analysis of regression models. Maximum **TPC**, **FC**, and **AoxA** were attained at 34°C for 171 h. Optimized germinated chickpea flour (**OGCF**) produced applying the optimal germination conditions resulted in an increase of protein and total dietary fibre content, **TPC**, **FC**, phenolic acids profile, and **AoxA**. Germination in optimal conditions significantly increased the level of Coumaric, Ferulic, Synapic, Ellagic, and Syringic acids. The germination bioprocess under optimized conditions increased the cellular antioxidant activity (**Aox<sub>cellular</sub>A**) of the free and bound fractions of chickpea desi; The fractions of **OGCF** presented higher values of **Aox<sub>cellular</sub>A** than those of raw whole chickpea flour (**RWCF**) (222.2 - 788.3 vs 41.21- 137.22  $\mu$ M EQ/100 g sample). Extracts of **OGCF** and **RWCF** showed inhibition of proliferation of breast cancer cells, 9-53% and 2.7-28%, respectively. The inhibitory concentration of cell growth (**IC<sub>50</sub>**) was 3.4 and 52.7 mg / ml for extracts of **OGCF** and **RWCF**, respectively. The percentages of apoptotic breast cancer cells for extracts of **OGCF** and **RWCF** were 54% and 41%, respectively. The germination of chickpea desi, carried out under optimal conditions, improves the nutraceutical value of the seed. The **OGCF** and / or its extracts can be used as functional ingredient / food for the prevention of chronic degenerative diseases due to its antioxidant and anticarcinogenic potential; their use as a source of natural bioactive compounds in functional foods may be recommended.

**Keywords:** Desi chickpea, Germination, Antioxidant activity, Phenolic acid

## II INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo, los productos naturales obtenidos principalmente de plantas han sido usados como una fuente prominente de agentes profilácticos para la prevención y tratamiento de enfermedades en humanos y animales (Bagchi, 2006). Hipócrates (460-370 ac) declaró “Permite que la comida sea tu medicina y que la medicina sea tu alimento”. Hoy en día la relación entre alimento y medicina es cada vez más estrecha (Bernal y col, 2011). Así surge hace más de 20 años el término nutracéutico el cual describe la unión entre nutrición y medicina, ambos constituyentes principales de la salud humana (Haller, 2010).

Alrededor el 40% de los fármacos se obtienen de una fuente vegetal; fármacos como antibióticos, agentes de control, inmunosupresores para trasplantes de órganos o fármacos contra el cáncer han sido encontrados o producidos de esta manera (Simmonds, 2003; Li y Vederas, 2009).

En las últimas dos décadas un gran número de investigaciones se han dedicado al estudio de los alimentos funcionales y nutracéuticos. Los hallazgos en este rubro muestran perspectivas prometedoras y se observa un crecimiento exponencial en este tipo de investigaciones (Bernal y col, 2011). Algunas de estas investigaciones se relacionan con el consumo de alimentos de origen vegetal los cuales contienen compuestos no nutritivos (fitoquímicos) como polifenoles que promueven actividades biológicas tales como antioxidante, antiinflamatoria e hipocolesterolemica (Balisterio, 2013). Dentro de estos alimentos se encuentran las leguminosas; el consumo de estos granos se ha relacionado con efectos benéficos a la salud (Campos-Vega y col, 2010).

Las leguminosas representan un importante componente en la dieta humana, son una buena fuente de nutrientes importantes como proteínas, fibra dietaria, minerales, vitaminas y compuestos menores que son responsables de diferentes actividades biológicas, aunque han sido considerados como factores antinutricionales, hay evidencia del impacto potencial que tienen contra la obesidad, diabetes, enfermedades del corazón y el cáncer, debido a ello, son

actualmente conocidos como ingredientes nutraceuticos (López-Martínez y col, 2017).

El consumo frecuente de leguminosas (cuatro o más porciones por semana) se ha asociado con una disminución de 22% y 11% sobre el riesgo de padecer enfermedades coronarias y cardiovasculares respectivamente (Flight y Clifton, 2006) así como diabetes tipo 2 (Villegas y col, 2008), hipercolesterolemia (Anderson y Major, 2002) y algunos tipos de cáncer (Lila, 2009). Dentro de las leguminosas usadas para consumo humano se incluyen frijol, chícharo, lenteja y garbanzo (Rochfort y Panozzo, 2007). El garbanzo es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial, en la actualidad se cultiva en alrededor de 11 millones de hectáreas, con 96% del cultivo en los países en desarrollo (ICRISAT, 2013). Existen dos tipos de garbanzo en base a su color y distribución geográfica: desi (origen en la India) que puede ser de color café, amarillo, naranja, negro o verde y kabuli (origen en la región Mediterránea y el Medio Oriente) de color blanco o crema (Chavan y Kadam, 1989).

Los métodos de procesamiento de leguminosas (descascarillado, remojo, cocción, extrusión, fermentación, germinación) influyen, en composición química, valor nutricional, presencia de compuestos bioactivos y propiedades nutraceuticas; algunos procesamientos biológicos como la fermentación y la germinación, mejoran el valor nutricional y propiedades nutraceuticas de las leguminosas (Frías y col, 2005; Reyes-Bastidas y col, 2010; Wu y col 2012; Xiao y col, 2014; Dey y col, 2016; Khang y col, 2016).

La germinación representa una alternativa tecnológica para mejorar la calidad nutricional y nutraceuticas de una gran cantidad de cereales y leguminosas, es un proceso natural para la obtención de alimentos muy extendido en todo el mundo; la germinación implica una intensa actividad metabólica. Durante la germinación tienen lugar varias transformaciones; los cambios químicos que ocurren en la semilla al germinar activan una fábrica enzimática poderosa, que no se supera nunca en cualquier estadio posterior de crecimiento (Klaus, 1980).

El objetivo de la presente investigación fue estudiar las condiciones para llevar a cabo el bioprocesamiento de germinación de garbanzo para mejorar los potenciales antioxidante y antiproliferativo de células de cáncer de mama e identificar los compuestos bioactivos relacionados con estos potenciales.

### III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### A ESTRÉS OXIDATIVO

##### 1 Estrés oxidativo

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Esto tiene como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Ames y col, 1983). El estrés oxidativo está asociado con algunas patologías como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (López-Alarcón y Denicola, 2012). Los agentes oxidantes son denominados radicales libres.

##### 2 Radicales libres

Un radical libre es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz, con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Una vez generados, los radicales libres se estabilizan al ganar otro electrón quizá uniéndose a otro radical, o bien al ser oxidados o reducidos por otra estructura molecular adyacente (Halliwell, 1994).

##### 3 Especies reactivas de oxígeno

Aproximadamente el 90 % del oxígeno que consumimos se destina a la fosforilación oxidativa. Las enzimas que requieren oxígeno para las reacciones de hidroxilación y oxigenación utilizan otra fracción de aproximadamente el 10 %. Una fracción residual, en torno al 1 % se convierte en especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, que son formas reactivas de oxígeno intrínsecamente tóxicas. Las ROS son importantes en el metabolismo, algunas enzimas utilizan  $H_2O_2$  como sustrato y

desempeñan un papel en la regulación del metabolismo y en las defensas inmunológicas contra la infección. Sin embargo, las ROS son también una fuente de daño crónico para las moléculas biológicas tisulares, inducen peroxidación lipídica, alteración de las proteínas y del ácido desoxirribonucleico ADN (López-Alarcón y Denicola, 2012).

#### **4 Daños por ROS a biomoléculas**

##### **a Lípidos**

La peroxidación de lípidos es considerada como el proceso más perjudicial que se produce en el organismo vivo. El daño a la membrana se toma como parámetro único para determinar el nivel de destrucción de lípidos bajo varios tipos de estrés. La acción de las ROS sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados generando peróxidos, los cuales son degradados hasta formar especies reactivas. La oxidación de lípidos que forman parte de la membrana celular afecta tanto a las propiedades físicas (fluidez y permeabilidad) como a la funcionalidad de las proteínas de la membrana (Droge, 2002). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), el alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y el radical alquilo ( $\text{R}\cdot$ ). El mecanismo de peroxidación de lípidos comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno y se forma un radical alquilo. Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace. Este radical reacciona con el  $\text{O}_2$  y forma un radical peróxido ( $\text{R-CO}\cdot$ ). Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes formando un radical alquilo ( $\text{R}'\text{-CH}\cdot$ ) y un peróxido lipídico ( $\text{R-COOH}$ ), con lo que se produce una reacción en cadena.

El efecto global de la peroxidación de lípidos es disminuir la fluidez de la membrana, facilitar el intercambio de fosfolípidos entre las dos mitades de la bicapa, aumentar la permeabilidad de la membrana a las sustancias que

normalmente no se cruzan a través de canales específicos y dañan la membrana proteínica, inactivando receptores, enzimas y canales iónicos (Singh y Tuteja, 2010).

## **b Proteínas**

La oxidación de proteínas se define como la modificación covalente de una proteína inducida por ROS o subproductos de estrés oxidativo. La mayoría de la oxidación de proteínas es esencialmente irreversible (Ghezzi y Bonetto 2003). La carbonilación de una proteína es utilizada como marcador de la oxidación de proteínas. La oxidación de una serie de aminoácidos en particular Arginina, Histidina, Lisina, Prolina, Treonina y Triptfano producen grupos carbonilo libres, los cuales podrían inhibir o alterar su actividad e incrementar la sensibilidad hacia el ataque proteolítico (Moller y col 2007). La carbonilación de proteínas podría generarse a través de la oxidación directa de cadenas laterales de aminoácidos (p. ej. Prolina y Arginina *para-Y*-glutamil semialdehído, Lisina *para*-aminoadípico semialdehído y Treonina *para*-aminocetobutirato). Cualquiera que sea la ubicación de la síntesis y la acción de los ROS, es probable que estos se dirijan a proteínas que contienen aminoácidos azufrados y grupos tiol. Cisteína y Metionina son muy reactivos, especialmente con  $O_2^{\bullet-}$  y  $OH^{\bullet}$ . El oxígeno activado podría abstraer un átomo de hidrógeno de residuos de Cisteína para formar un radical tiol que podría a través de un enlace cruzado ligarse a un segundo radical tiol para formar puentes disulfuro (Hancock y col, 2006).

## **c Ácido desoxiribonucleico (ADN)**

El ADN del núcleo y de la mitocondria, son susceptibles de sufrir daños oxidativos debido, principalmente, a la cercanía donde las especies reactivas son generadas. Existen diferentes tipos de daño que sufre el ADN tales como: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las dos hebras; modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación



de uniones cruzadas (cross-links) ADN-ADN o ADN-proteína. Por ejemplo, la acción del OH da lugar a más de 20 modificaciones y entre ellas la más frecuente es la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OH-dG) que tiene un potencial altamente mutagénico (Jaruga y col, 1996). El daño producido en el ADN induce error frecuente de forma irreversible en las señales de transcripción y traducción. Los errores en la replicación y la inestabilidad genómica están asociados a carcinogénesis. El daño generado al ADN se conoce como “daño espontáneo ADN” que es producido por metabolitos reactivos ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{NO}^\bullet$ ). Se ha reportado que el radical más reactivo es el  $\text{OH}^\bullet$ , causa deterioro a todos los componentes de la molécula de ADN, dañando tanto las bases purina y pirimidina, de la misma forma, a la columna vertebral desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge 1999).

## **B INFLAMACIÓN Y CÁNCER**

### **1 Tipos de inflamación**

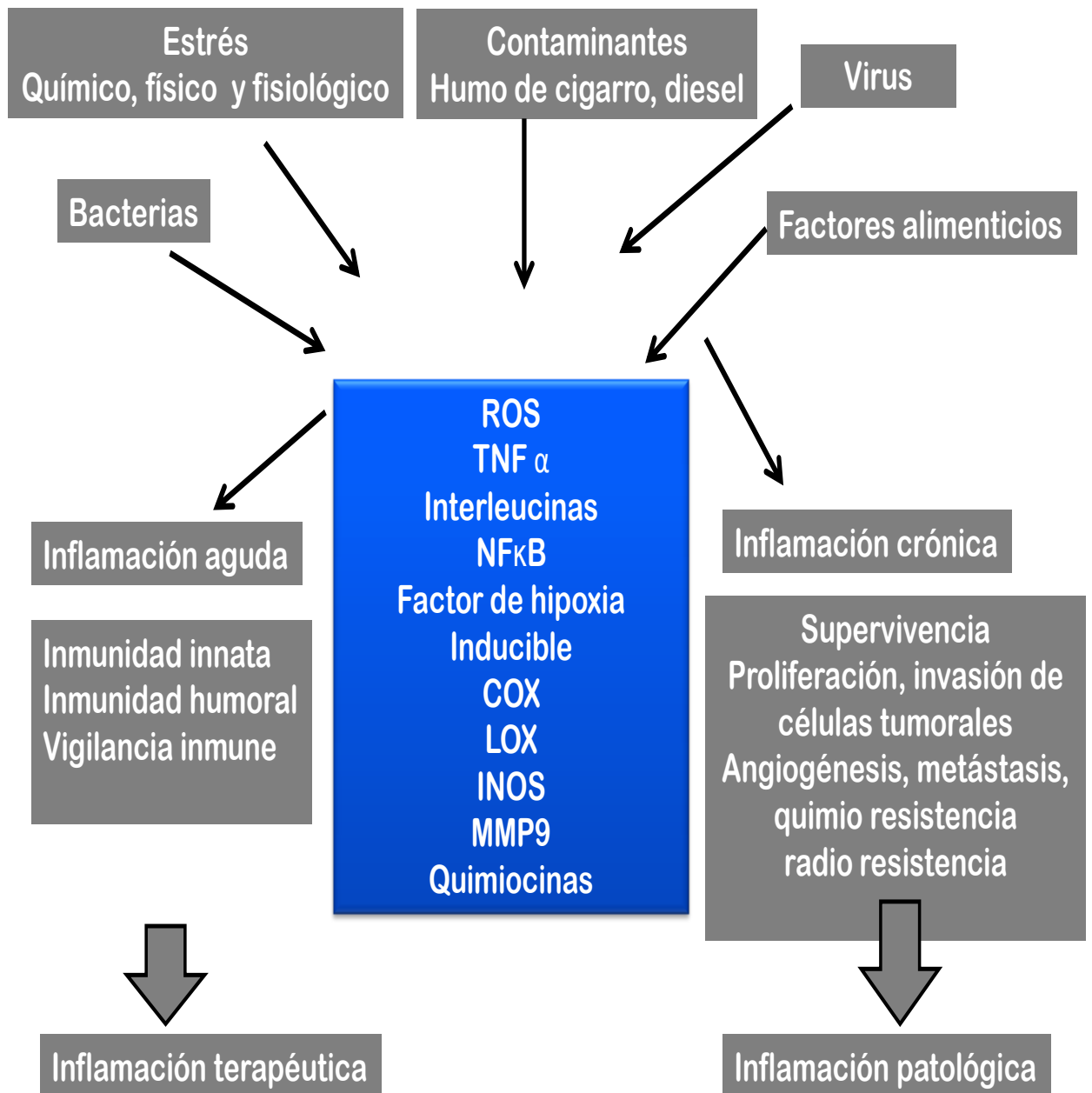
La inflamación es la respuesta del organismo a estímulos externos o internos; esta respuesta sirve para contrarrestar una lesión o daño sufrido, puede ser pirogénica e inducir fiebre durante un periodo corto de tiempo, provocando así una inflamación aguda, también llamada inflamación terapéutica. Sin embargo, cuando la inflamación llega a ser crónica o dura demasiado tiempo esta puede ser dañina y conducir al desarrollo de una enfermedad (Aggarwal y col, 2006). La inflamación crónica es considerada un proceso que regula un amplio grupo de enfermedades como: enfermedades pulmonares, cardiovasculares, cáncer, diabetes, artritis, Alzheimer y enfermedades autoinmunes (Aggarwal, 2004).

La inflamación causa la activación de componentes celulares del sistema inmune. La respuesta inicial envuelve el sistema inmune innato por lo cual diversas células que incluyen macrófagos, mastocitos, dendríticas y células “natural killer” (células naturales asesinas) convergen en el sitio de la lesión. Mediadores químicos liberados por las células inmunes innatas, como Citocinas,

Quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), permiten el reclutamiento de leucocitos en la zona de la lesión o infección y permiten la eliminación del patógeno y/o reparan el tejido, iniciando la respuesta inmune adaptativa (Moore y col, 2010). La generación de mediadores inflamatorios puede activar varias rutas de señalización que modulan la proliferación celular, muerte celular, así como diferenciación y amplificación de la respuesta a la lesión inicial. La respuesta del tejido lesionado o una infección requiere de una interacción organizada de células del sistema inmune y células inflamatorias así como sus productos. La inflamación crónica (también llamada inflamación no resolutive) es prolongada, desregulatoria y genera una respuesta que envuelve una inflamación activa y persistente, la destrucción de tejidos e intentos fallidos de reparar al mismo (Wu y Scahuss, 2012). Este tipo de inflamaciones han sido relacionadas con la tumorigenesis, incluyendo la transformación celular, promoción, supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis (Mantovani, 2005; Coussens y col, 2002) (**Fig 1**).

## **2 Bases moleculares de la inflamación**

Las células inflamatorias producen mediadores solubles, como metabolitos de ácido Araquidónico, Citoquinas y Quimiocinas, que actúan incorporando un mayor número de células inflamatorias al tejido dañado, generando más especies reactivas. Estos mediadores son clave, porque podrían activar una cascada de señales de transducción, además cambios inducidos en factores de transcripción, como factores nucleares kB (NF-κB), transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3), factor de hipoxia inducible 1α (HIF-1α), activador de proteína-1 (AP-1), factor nuclear de activador de células T, y NF-E2 relacionados al factor-2 (Nrf2), todos ellos participan en respuesta al estrés celular. La inducción



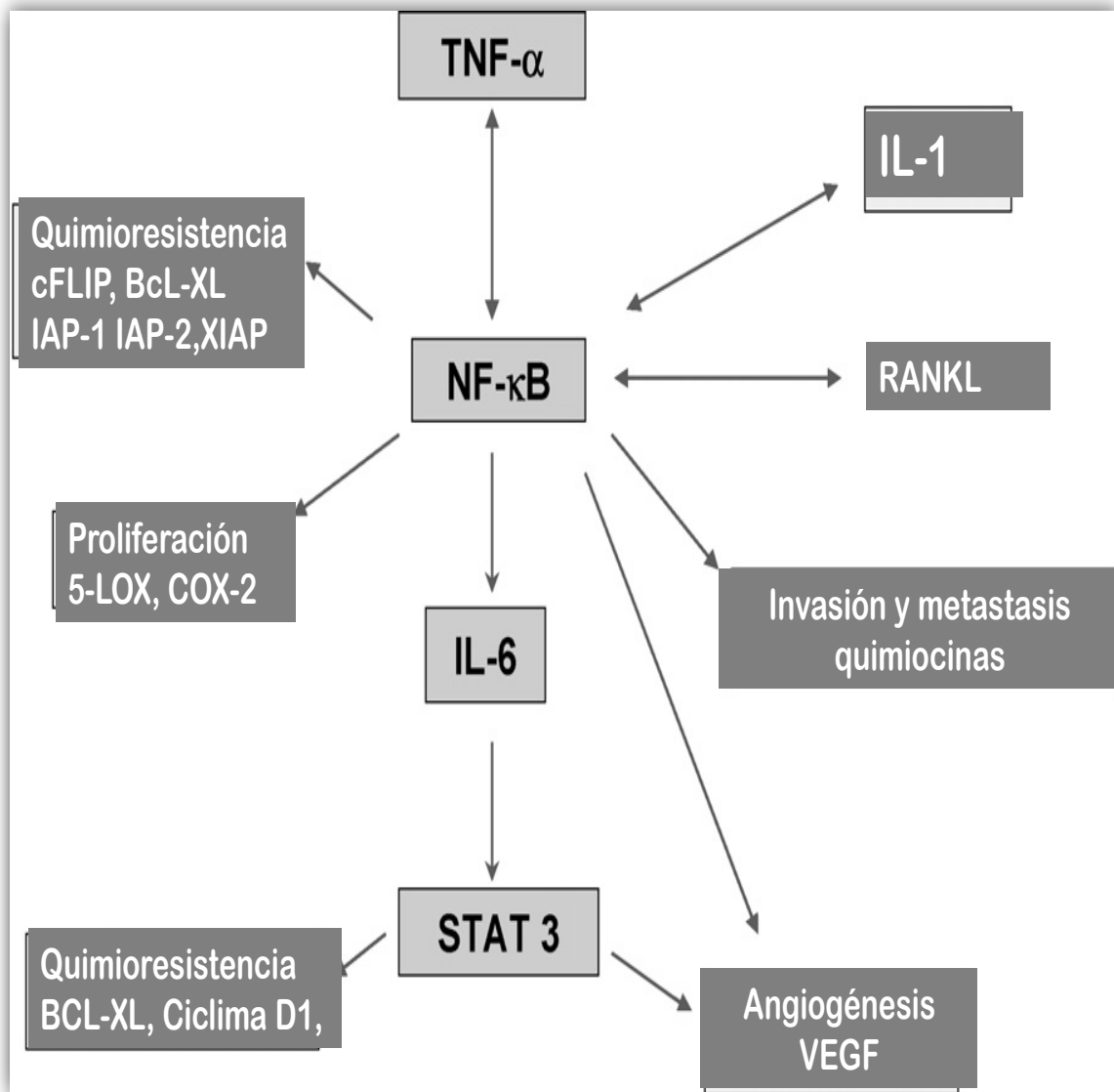
**Fig 1.** Diferentes fases de la inflamación y su rol en tumorigénesis  
**Aggarwal (2006)**

de la Ciclooxygenasa-2, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), Citocinas inflamatorias de expresión anormal [factor de necrosis tumoral (TNF), Interleucinas -1(IL-1), (IL-6) y Quimiocinas (IL-8, Quimiocinas CXC receptor de 4 (CXCR4)], así como alteraciones en la expresión de microARN específicos, generan estrés oxidativo e inducen inflamación (Hussain y Harris, 2007). En el proceso de carcinogénesis intervienen los radicales libres, muchos de ellos mediados por la inflamación propiciando reacciones en cadena. La expresión de todos estos genes está regulada principalmente por el factor de transcripción NFκB que está constitutivamente activo en la mayoría de los tumores.

El factor de transcripción NFκB es una familia de dímeros de proteína estrechamente relacionados, que se unen a una secuencia motivo en el ADN llamado sitio κB (Aggarwall, 2004). Bajo condiciones de reposo el dímero NFκB reside en el citoplasma. NFκB es activado por radicales libres, estímulos inflamatorios, citocinas, carcinógenos, promotores de tumores, radiación UV y rayos X. Una vez activado se transloca hacia el núcleo de la célula donde induce la expresión de más de 200 genes que han mostrado actividad supresora de apoptosis e inducen la transformación, proliferación, invasión, metástasis, quimioresistencia, radioresistencia e inflamación. Muchos de estos genes activados son críticos en el establecimiento de la agresividad de cáncer en estados tempranos o tardíos, incluyendo la expresión de Ciclinas D1, y proteínas supresoras de apoptosis como Bcl-2 Y BcXL, y los requeridos para la metástasis y angiogénesis como metaloproteínas de matriz extracelular (MMP) y factor de crecimiento endotelial vascular (Aggarwal, 2006) (**Fig 2**).

### **3 Bases moleculares del cáncer**

El cáncer es una enfermedad celular, propia de organismos multicelulares. Se debe a la alteración de los mecanismos reguladores de la división celular en un tejido u órgano, produciendo un daño en el ADN celular, que excede los dispositivos protectores. Es el producto final de una proliferación descontrolada de

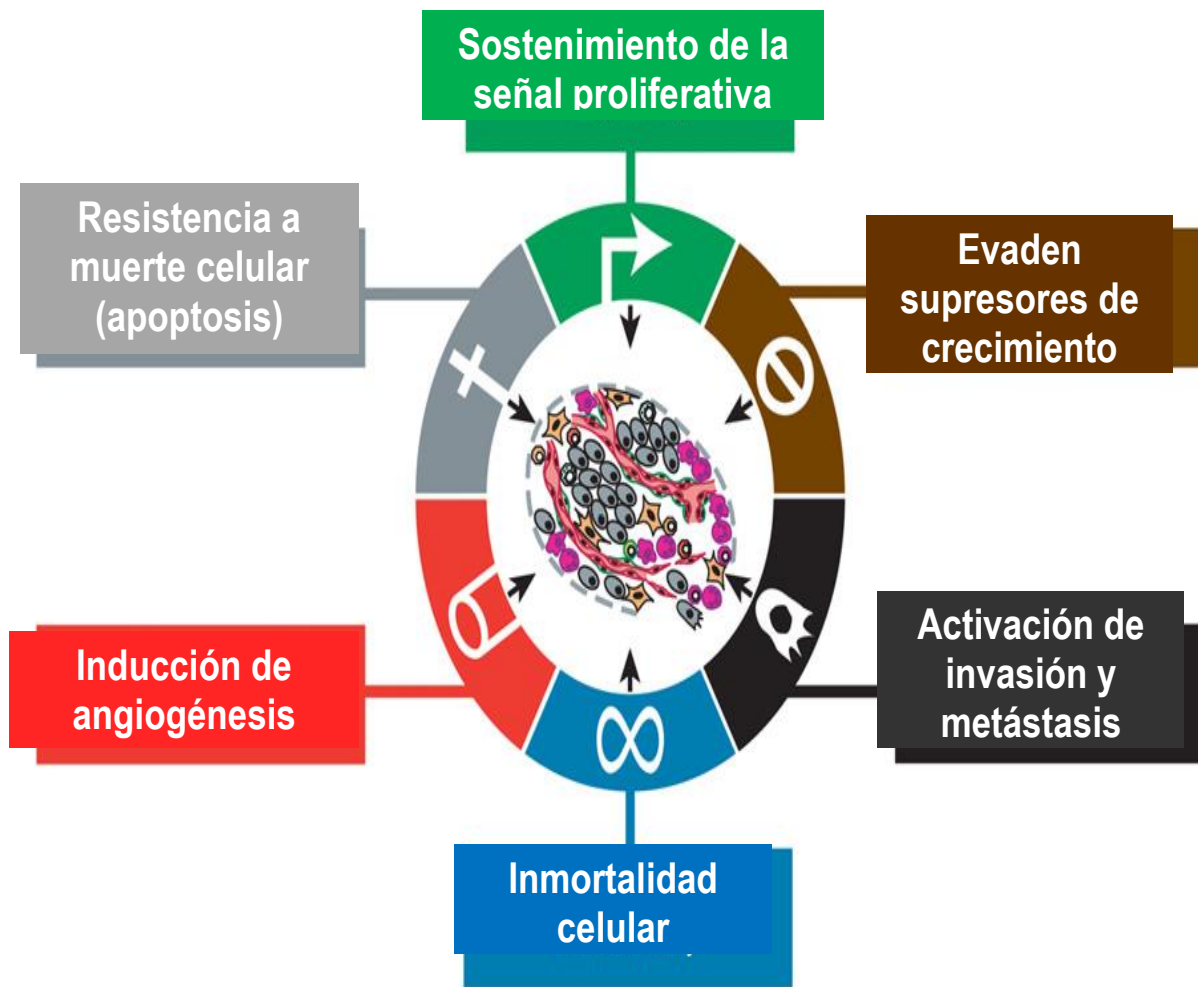


**Fig 2. Cadena inflamatoria y cáncer**  
**Aggarwal (2006)**

células, como resultado de la acumulación de alteraciones secuenciales genéticas (mutaciones) en una célula precursora. Esta población celular continúa mutando y perpetuándose mediante la secreción de factores de crecimiento y angiogénicos propios (Welbourne, 2003). Al ser un proceso multifactorial puede ser activado por varios carcinógenos ambientales como humo de cigarro, emisiones industriales, vapores de gasolina, agentes inflamatorios como factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) y peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como promotores tumorales (ésteres de forbol y ácido Okadaico). Estos carcinógenos modulan factores de transcripción (NFκB, AP-1, STAT 3), proteínas antiapoptóticas (AKt, Bcl2, Bcl-XL), proteínas apoptóticas (Caspasas, PARP), proteínas Quinasas (Ciclinas y Quinasa dependientes de Ciclinas), moléculas de adhesión, Ciclooxygenasas (COX) y vías de señalización de factores de crecimiento (Aggarwal, 2006). La expresión aberrante de genes conduce a un número de cambios importantes en el proceso biológico en células de cáncer, los cuales son llamados rasgos distintivos y características moleculares del cáncer, comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores humanos. Las señas de identidad constituyen un principio de organización para la comprensión de la complejidad de la enfermedad (Hanahan y Weinberg, 2011) (Fig 3).

#### **a Factor de crecimiento independiente**

La unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés), a un sitio específico de receptores, permite que una señal pase de la membrana hacia el núcleo vía cascada de mensajeros intermedios, de tal manera que el ligando unido en la superficie celular altera el comportamiento de la misma. Bajo condiciones normales la activación de los receptores del factor de crecimiento está muy controlada (como lo es la síntesis y liberación de los ligandos estimulantes). Las células de cáncer frecuentemente usurpan las rutas del factor de crecimiento y lo usan para promover una incontrolable división celular (Rogers y col, 2005). Las células de cáncer tienen tres estrategias principales para lograr



**Fig 3.** Sellos distintivos del cáncer  
Hanahan y col (2011)

la autosuficiencia en cuanto al crecimiento: manufacturan y liberan el factor de crecimiento el cual estimula sus propios receptores (señalización autocrina) y los de sus vecinos inmediatos (señalización paracrina), alteran el número, la estructura o función de los receptores de factor de crecimiento en su superficie, de tal manera que hay muchas probabilidades de enviar una señal de crecimiento hacia el núcleo (incluso en ausencia del ligando) y desregulan la ruta de señalización del receptor de crecimiento corriente abajo lo que permite que esté permanentemente encendido (activo) (Harrington, 2011).

### **b Insensibilidad a las señales anticrecimiento**

Algunas señales normales anticrecimiento contrarrestan positivamente las señales de crecimiento descritas anteriormente. Su manera de trabajar es obligando a las células a que entren en reposo (fase G<sub>0</sub> del ciclo celular) o mediante la inducción de su diferenciación terminal, de tal manera que son permanentemente incapaz de re-entrar al ciclo celular. La señalización anticrecimiento es mediada por ligandos que actúan en receptores celulares (TGF- $\beta$ , factor decrecimiento transformante, por sus siglas en inglés) y envía señales al núcleo vía segundos mensajeros. Estas rutas son principalmente envueltas en el control del ciclo celular y median su efecto a través de proteínas que incluyen Proteína Retinoblastoma (RB), Ciclinas, Quinasas dependiente de Ciclinas (CDK) y sus inhibidores (CDKi). Anormalidades en las rutas de señalizaciones anticrecimiento son extremadamente comunes en cáncer y brindan ayuda importante a las células cancerosas a progresar a través del ciclo celular. Por lo tanto la pérdida de las proteínas RB y de miembros de la familia de inhibidores CDKi y la sobreexpresión de ciertas ciclinas y CDK se han encontrado en un gran número de tumores (Harrington, 2011).

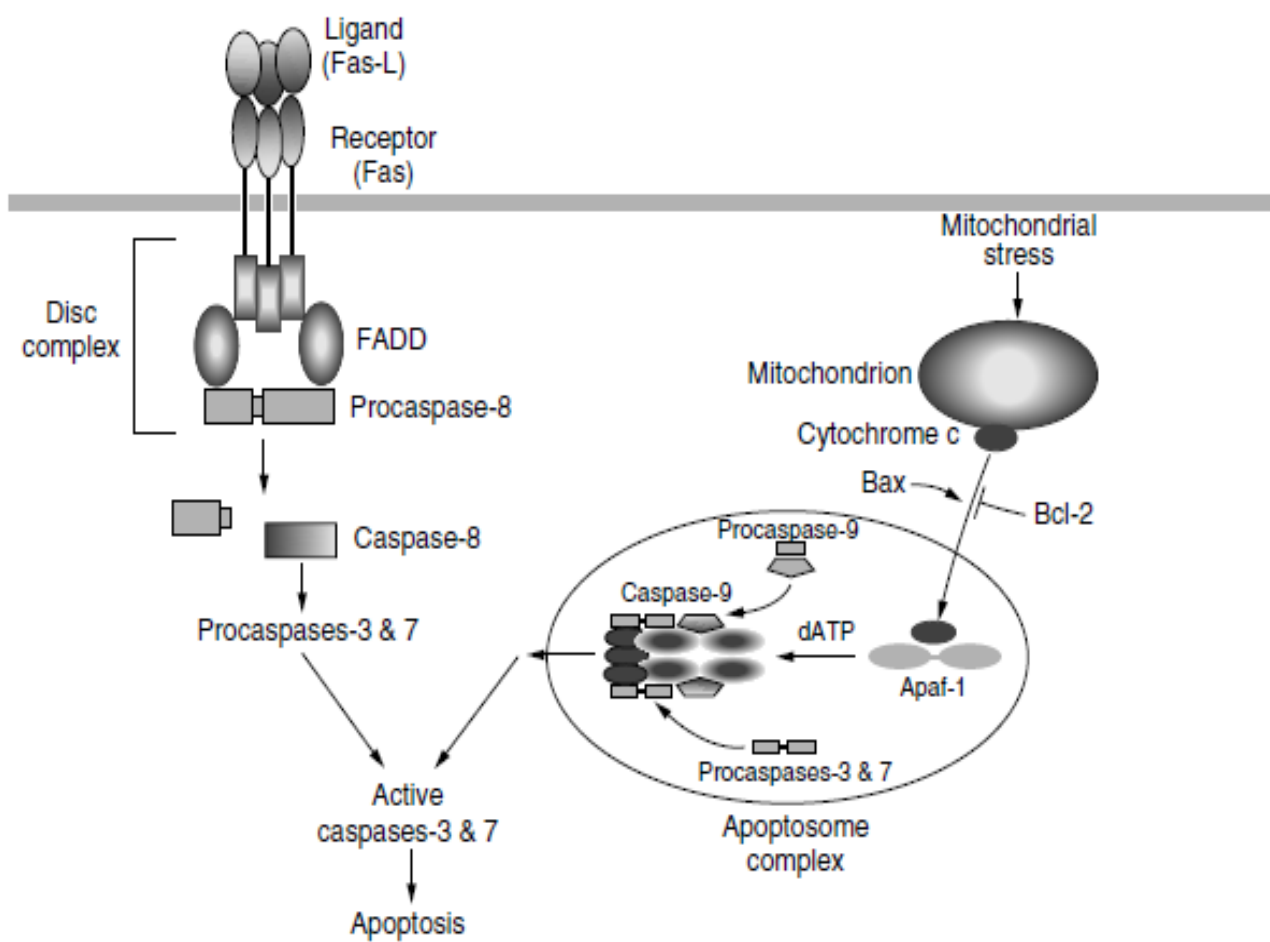


### **c Resistencia a muerte celular programada o apoptosis**

Las células normales continuamente auditan su viabilidad de acuerdo a las señales que reciben, mediante la evaluación del equilibrio entre la supervivencia (anti apoptosis) y muerte (pro-apoptosis). En células normales se bloquea la proliferación del DNA dañado (detención del ciclo celular) mientras se evalúa el potencial de reparación. Si el nivel de daño excede la capacidad para reparar, el balance indica que la célula sufrirá muerte celular programada (apoptosis). Esto previene que se mantenga el DNA dañado y evita el riesgo de que las mutaciones pasen a la progenie en la división celular. Este mecanismo representa una poderosa barrera en el desarrollo del cáncer. La pérdida de la ruta apoptótica normal es un evento extremadamente común en cáncer. De hecho dos de los genes más conocidos y relacionados con el cáncer son gen p53 (gen supresor de tumores) y bcl-2 (oncogen) están íntimamente involucrados en la apoptosis. Los dos principales mecanismos de señalización para la apoptosis son la vía intrínseca y la extrínseca (**Fig 4**).

Las células de cáncer son capaces de evadir la apoptosis debido a su habilidad para ignorar la señales enviadas a través de rutas extrínsecas o volviendo a ajustar el balance de moléculas pro y antiapoptosis a favor de la inhibición de la apoptosis. Por eludir la apoptosis, las células de cáncer pueden sufrir daño en el DNA sin que cause muerte celular (a menos que el daño se presente en un gen absolutamente necesario para la sobrevivencia de la célula). Además las células de cáncer tienen apagada la ruta apoptótica y son más resistentes a los tratamientos anticancer. De hecho el uso de estos tratamientos podría promover el acumulo de otras mutaciones que pudieran tener una influencia negativa en la biología de la enfermedad (Harrington, 2011).

La morfología celular característica de las células sometidas a apoptosis incluye cambios en la membrana celular tales como pérdida de la asimetría y fijación de membrana, fragmentación nuclear, condensación de cromatina y fragmentación cromosómica del ADN (Hengartner, 2000). Se han descrito dos mecanismos principales de muerte celular que son apoptosis y necrosis. La



**Fig 4.** Vía extrínseca e intrínseca de apoptosis  
**Martínez y col (2003)**

necrosis es una forma diferente de muerte celular que resulta de una lesión celular aguda e implica un daño externo de la célula, mediada por la destrucción de la membrana plasmática. La apoptosis es diferente de la necrosis ya que los procesos asociados con la apoptosis en cuanto eliminación de los desechos celulares no dañan el organismo. La apoptosis desempeña una forma muy eficiente de defensa contra el cancer (Ghavami y col, 2009)

#### **d Angiogénesis sostenida**

En tejidos normales, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) está controlado por el balance entre las señales positivas (proangiogénesis) y negativas (antiangiogénesis). El crecimiento del cáncer está íntimamente relacionado con su habilidad para asegurar el suministro de sangre. Un pequeño grupo de células cancerosas pueden crecer de 60-100  $\mu\text{m}$  mediante un suministro de oxígeno y nutrientes por difusión directa, pero más allá del tamaño incipiente del tumor este requiere un suministro propio de sangre. El cáncer adquiere la habilidad para formar un nuevo vaso sanguíneo desestabilizando el balance entre los factores pro y antiangiogénicos. Esencialmente el cáncer regula la producción de proteínas proangiogénicas como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y/o por desregular la producción de proteínas antiangiogénicas como la Trombospondina 1 (Harrington, 2011)

#### **e Inmortalidad celular**

Las células somáticas normales pueden sufrir solo un número finito de división celular antes de entrar a un periodo permanente de detención del crecimiento conocido como senescencia replicativa. Este proceso ocurre como resultado de la inhabilidad de las células para replicar la parte terminal de sus cromosomas (telómeros) al final de cada división celular. Por lo tanto con el tiempo estos se van acortando progresivamente actuando como relojes moleculares controlando la vida de la célula. En contraste las células madre y las células malignas adquieren

inmortalidad porque mantienen la longitud de sus telómeros. En muchos tumores esto ocurre a través de la regulación de la enzima telomerasa, pero en el 10-15 % de los casos el responsable es otro mecanismo llamado alargamiento de telomerasa alternativo (ALT). La actividad enzimática de la telomerasa envuelve un gran número de proteínas pero los componentes principales son el RNA plantilla (hTR) y la enzima transcriptasa reversa (hTERT), la enzima transcriptasa reversa usa el RNA hTR como una guía en la re-síntesis de la secuencia del DNA del telómero. Por lo tanto tumores que tienen reactivado la expresión de la telomerasa son capaces de reconstruir las partes de sus telómeros que habían perdido en cada ronda de división celular y con ello evitan la senescencia replicativa (Harrington, 2011)

#### **f Invasión y metástasis**

La metástasis distante causa el 90% de las muertes por cáncer. Invasión y metástasis envuelve cuidadosamente una serie de procesos biológicos complejos: desprendimiento de vecinos inmediatos y estroma en el sitio local, digestión enzimática de la matriz extracelular seguido por motilidad direccional específica, penetración de vasos sanguíneos y linfáticos y la embolización del tumor, supervivencia en la circulación hasta llegar al sitio metastásico, el cual es elegido en base a la provisión de un suministro favorable para su crecimiento, así como la adherencia de la metástasis al endotelio de los vasos sanguíneos en su destino y la proliferación e invasión de una nueva locación con incorporación de nuevos suministros de sangre (Harrington, 2011).

#### **4 Genes del cáncer**

El cáncer es derivado de dos clases de genes (oncogenes y genes supresores de tumores), los cuales proveen una función esencial en células normales. Los primeros son derivados de versiones mutadas de genes de células normales (llamados proto-oncogénes) que controla la proliferación celular, supervivencia y la propagación. En células normales, la expresión de proto-oncogénes está muy

estrechamente regulada para evitar el crecimiento descontrolado. En cáncer, la activación de mutaciones de proto-oncogénos es responsable de la división celular descontrolada, mejorando la sobrevivencia y su diseminación. Oncogenes son descritos como fenotípicamente dominantes (una sencilla copia mutada de un proto-oncogen es suficiente para promover el cáncer) y, generalmente, no está asociado con síndromes de cáncer heredado). Por otra parte los genes supresores de tumores (TSG, por sus siglas en inglés) son genes normales de células cuya función abarca la inhibición de la proliferación celular y sobrevivencia. Ellos están frecuentemente envueltos en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis. TSG son fenotípicamente recesivos (la función de ambas copias deben presentar mutación para perder el control y promover el cáncer) y son responsables de los síndromes de cáncer heredados (Harrington, 2011).

Cuando la célula tiene mutaciones en su ADN puede tener alterados genes específicos (**BRCA1**, **BRCA2** y **p53**) que predisponen a las células a ser cánceres más agresivos. Éstos participan en la respuesta celular cuando hay daño al ADN y cuando existe este daño el organismo induce la muerte celular como sistema de protección para eliminar células potencialmente peligrosas (Imyanitov y col, 2004). También pueden alterarse algunos oncogenes como son **ras**, **myc**, **fos** y **c-fms** que por mutaciones puntuales pueden cambiar un aminoácido específico de la proteína con lo cual puede inhibir su función. Existen otros genes como el gen **Rb**, cuya pérdida de función se asocia a la aparición de varios tipos de cánceres como de próstata, mama y pulmón. El gen que codifica para la proteína **Rb** es un factor de transcripción y es el blanco de inactivación de los productos proteínicos de los virus tumorales como el virus del papiloma, durante la oncogénesis. Otro gen importante es **p53** que es un supresor de tumores y la pérdida de su función se ve implicada en el desarrollo de cáncer de mama, colon, pulmón y cerebro. El gen **Bcl-2** es un gen regulador de la muerte celular programada, la proteína sintetizada a partir de este gen tiene función en la membrana celular de la mitocondria prolongando la vida de la célula individual, evitando apoptosis, permitiendo la

activación de proto-oncogénos o la pérdida de función de genes supresores de tumores (Meza-Junco y col, 2006).

## **C CÁNCER DE MAMA**

### **1 Epidemiología**

El cáncer de mama es una enfermedad con una evolución natural compleja por lo que a pesar de los avances de la oncología moderna, es la primera causa de muerte por neoplasias en la mujer en el ámbito mundial. En Estados Unidos de América se pronosticó que 12.3% de las mujeres serían diagnosticadas con algún tipo de cáncer de mama, con diversas respuestas terapéuticas (Robles-Escajeda y col, 2016). En México a partir del año 2006 el cáncer de mama ha sido la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años, y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres; en 2008 murieron 4,818 mujeres mexicanas, lo cual implica un fallecimiento cada dos horas (Knaul y col, 2009).

### **2 Tipos de neoplasias mamarias**

Más del 90% de las neoplasias mamarias derivan de los componentes epiteliales de la mama. Según Rosen (1979) la patología del carcinoma mamario se clasifica, según las características estructurales y el lugar, en: **(i) Cáncer de mama no invasivo (*in situ*).**- Las células tumorales permanecen confinadas en la estructura ductal o lobular por lo cual existen el carcinoma ductal (*in situ*) el cual se origina en células de las paredes de los conductos mamarios, muy localizado aún no se ha extendido a otras zonas y no ha producido metástasis. Se le considera enfermedad premaligna y se puede extirpar fácilmente, representa aproximadamente entre el 10 y el 20 % de los casos. El carcinoma lobular *in situ* que se origina en células mamarias (lóbulos). No se considera un verdadero cáncer ya que es principio en benigno, aunque aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en el futuro. Es poco frecuente, representando entre 1 y 5% de los casos diagnosticados. **(ii) Cáncer de mama invasivo.**- Las células cancerígenas son

capaces de diseminarse mas allá del tejido en el cual apareció el tumor y crecer en los tejidos sanos adyacentes, se pueden subdividir en: carcinoma ductal infiltrante o invasivo el cual se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama desde donde puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el tipo más frecuente, siendo diagnosticado en aproximadamente el 80% de los casos. Por otra parte se encuentra el carcinoma lobular infiltrante o invasivo, este representa entre el 10 y el 15% de los carcinomas diagnosticados. En general está compuesto por pequeñas células uniformes que invaden el tejido parenquimatoso estructurándose en una sola fila y de forma concéntrica alrededor de los ductos. Comienza en las glándulas mamarias pero puede extenderse y destruir otros tejidos del cuerpo. Suele tener grado tumoral bajo con poca o nada atipia nuclear (variaciones anormales del tamaño, forma y constitución del núcleo) y tasa amitótica baja. Además al no formar micro calcificaciones, es difícil detectarlo con mamografías o ultrasonidos (Yoder y col, 2007).

### **3 Clasificación molecular del cáncer de mama**

El cáncer de mama es reconocido como una enfermedad heterogénea, clasificada en subgrupos moleculares con diferente pronóstico por su perfil de expresión genética (Sorlie y col, 2001). Se ha clasificado en tres grupos funcionales: **(i) Luminal.-** Este grupo expresa receptores de estrógenos. Se caracteriza por la alta expresión de genes asociados a las células epiteliales luminales y factores de transcripción que incluye al receptor estrogénico RE, además de citoqueratinas (CK) 7,8,18,19 (Matos y col, 2005). Existen dos subtipos, **Luminal A y B**; el **Luminal A** tiene expresión alta de genes relacionados con el **RE $\alpha$**  y expresión baja de genes relacionados con la proliferación celular comparado con el **Luminal B** (Sorlie y col, 2001). Los subtipos luminales presentan buen pronóstico y son lo más frecuentes correspondiendo al 67% de los tumores (Carey y col, 2004). **(ii) Subtipo que sobreexpresa HER2** (receptor epidérmico humano 2, por sus siglas en inglés). Este subtipo se refiere a un grupo de tumores **RE** negativo (-), estos tumores se clasifican por la sobreexpresión de

otros genes dentro del amplicon **ERBB2**, tal como **GRB7** (Perou y col, 2000) y presentan proporción alta de mutaciones en el gen **p53** (40-80%) (Sorlie y col, 2003), y **(iii) Subtipo basal.-** Llamado así por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario, este parecido es producto de la falta de expresión de **RE** y genes relacionados, baja expresión de **HER2**, intensa expresión de Citoqueratinas y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Perou y col, 2000; Sotiriou y col, 2003), también es conocido como triple negativo, por no expresar **RE**, **RP** ni **HER2**, este subtipo se ha asociado con mutaciones del gen supresor de tumores **BRCA 1** (Nielsen y col, 2004; Foulkes y col, 2004).

#### **a Línea celular de cáncer de mama triple negativo MDAMB231**

El cáncer de mama triple negativo (**CMTP**), se caracteriza por una historia clínica agresiva, desarrollo locoregional y patrón de metástasis a distancia hacia vísceras, cerebro, pulmón, huesos e hígado, lo que se traduce en un mal pronóstico con supervivencia corta y alta tasa de mortalidad (Fulford y col, 2007). Opciones terapéuticas de la enfermedad, incluyen terapia local o radiación, cirugía y el uso de fármacos. Sin embargo debido a sus características moleculares, este tipo de cáncer, no puede ser tratado eficientemente con tratamientos que habitualmente se usan en otros tipos de cáncer de mama (tratamientos hormonales o medicamentos que utilizan receptores **HER2**). Debido a que los pacientes con **CMTN** presentan mutaciones en el gen **BRCA1**, son particularmente sensibles a agentes que dañan el ADN, por lo que la quimioterapia citotóxica es una alternativa de tratamiento (Isakof, 2010). Tratamientos utilizando cisplatino en mujeres **CMTP** y mutaciones en el gen **BRCA1** sugieren una alta respuesta al cisplatino.

Cisplatino es un agente que daña el ADN, causando la muerte celular via formación de aductos a través de residuos de guanina. Cisplatino también puede inducir la muerte celular dañando proteínas citoplasmáticas, induciendo apoptosis (Galluzzi y col. 2012).

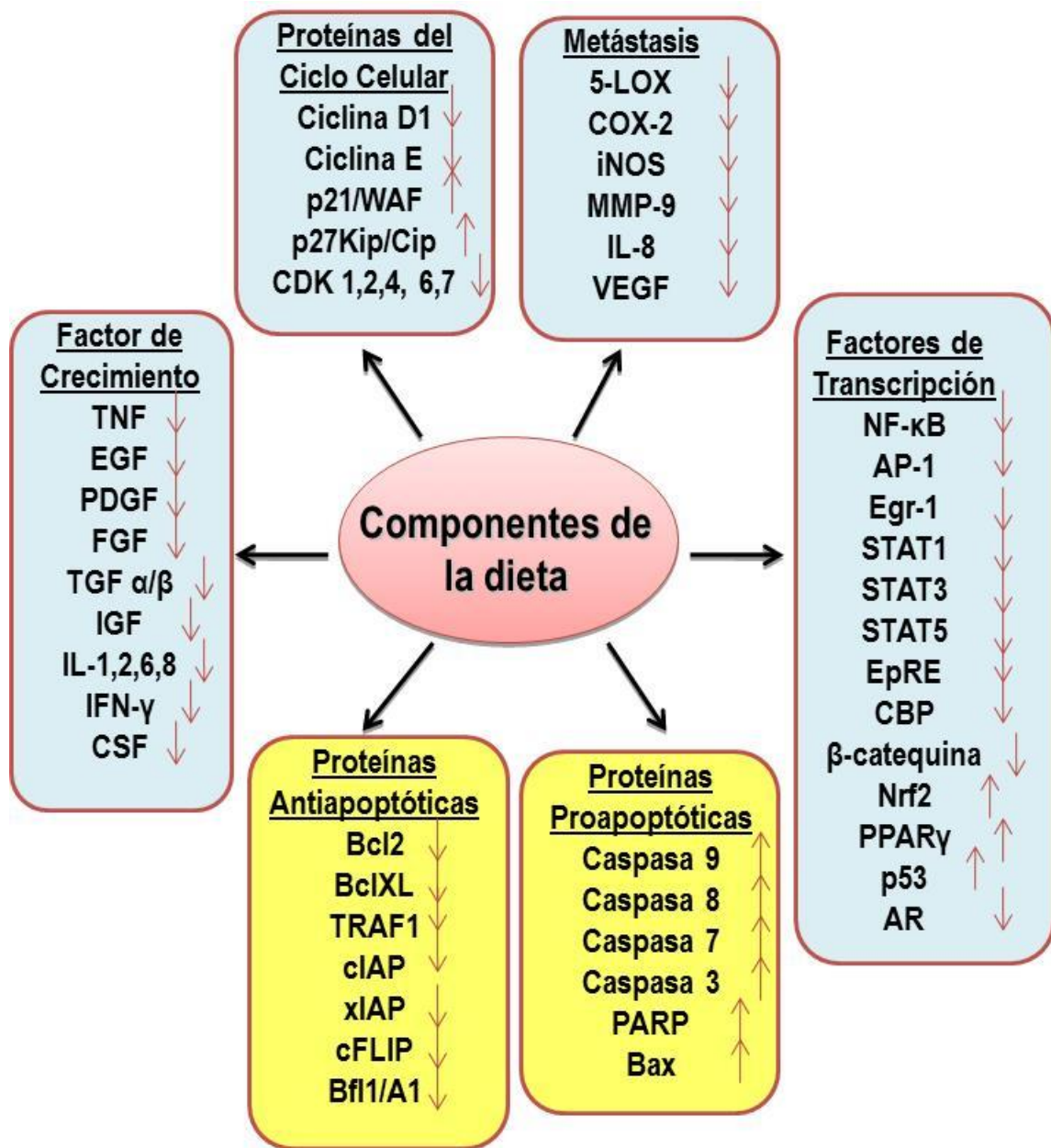


## D RELACIÓN ENTRE DIETA Y CÁNCER

Factores como el estilo de vida, la edad y la dieta, tienen un impacto significativo en la expresión y progresión del cáncer (Roleira y col, 2015). Se estima que aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a un alto índice de masa corporal, ausencia de actividad física, ingesta de alcohol, uso del tabaco y poca ingesta de frutas y vegetales (Bray y col, 2013). La obesidad y las enfermedades no transmisibles relacionadas a ella, afectan a más de uno por cada diez adultos (OMS, 2012). Las enfermedades crónicas no transmisibles (diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer) asociadas a la obesidad generan un estimado de 36 millones de muertes en el mundo cada año (Naciones Unidas, 2012).

Las frutas y vegetales son una excelente fuente de fibra, vitaminas y minerales; también contienen compuestos bioactivos (polifenoles, terpenos, alcaloides) que tienen efectos benéficos para la salud. Los compuestos activos que ofrecen mayor protección contra el cáncer son Genisteína, Resveratrol, Curcumina, Licopeno, Capsaicina, ácido Elágico, ácido Ursólico, Catequinas, inhibidores de proteasas, Saponinas, Isoflavonas, Fitoesteroles, vitamina C, E, Selenio, ácido Fólico, Luteína, Carotenoides y fibra dietaria. Estos agentes dietarios suprimen procesos inflamatorios que permiten la transformación, hiperproliferación e iniciación de la carcinogénesis. Esta influencia inhibitoria suprime etapas finales del cáncer como angiogénesis y metástasis (Aggarwal, 2006) (**Fig 5**).

Estudios *in vitro* en células de cáncer de mama MCF7 sugieren que fitoquímicos como polifenoles y en específico algunos flavonoides actúan en la inhibición de la enzima ADN dimetiltransferasa, la cual como su nombre lo indica hipermetila al ADN lo que provoca silenciar algunos genes, particularmente genes supresores de tumores (Paluszczak y col, 2010). Wang y col (2011) reportaron que uno de los mecanismos por los cuales los fitoquímicos de la dieta actúan en la prevención y tratamiento del cáncer se debe a su rol como antioxidantes; sin embargo, un fuerte potencial antioxidante no siempre resulta en actividad



**Fig 5.** Objetivo molecular de los agentes dietéticos  
Aggarwal (2006)

anticancerígena. El desarrollo del cáncer podría ser afectado mediante vías o mecanismos diferentes al efecto antioxidante como su actividad moduladora en rutas de señalización de proteínas Quinasas, inhibición de actividad enzimática de Ciclooxygenasa- 2 (COX-2), efecto fitoestrogénico, inducción de arresto del ciclo celular, inducción de enzimas metabolizantes **Fase I y II**, así como la inhibición de metaloproteínas y en el efecto sobre el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B).

Por otra parte, recientes investigaciones han demostrado que cierto grado de actividad física conduce a una mejora la calidad de vida de los sobrevivientes de cáncer, disminuye la fatiga y depresión (Fontein y col, 2013).

Así mismo se reportó la relación directa que existe entre la obesidad y distintos tipos de cáncer como el cáncer de colon, el postmenopáusico de mama, de endometrio, renal, y de esófago (Boeing, 2013). Debido a la naturaleza dietética de estos trastornos metabólicos, la solución necesariamente se relaciona con la dieta (Johnson y col, 2013). Es por ello que estudios epidemiológicos centran su interés en alimentos o ingredientes de alimentos con propósitos quimioterapéuticos y sugieren el consumo de alimentos funcionales.

## **1 Alimentos funcionales**

Según el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, por sus siglas en inglés) un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta a una o más funciones corporales específicas, más allá de sus efectos nutricionales intrínsecos, de modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y el bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas (ILSI, 1999).

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser: **(i)** Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo, **(ii)** Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal), **(iii)** Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos

efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados), **(iv)** Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteínicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad), **(v)** Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso, **(vi)** Cualquier combinación de las posibilidades anteriores (ILSI, 1999).

## **2 Nutracéuticos en los alimentos**

### **a Definición**

Todo un compendio de definiciones se utilizan para el término nutracéutico. Estas varían dependiendo el país, institución, organización y empresas comerciales. En general no existe una definición universalmente aceptada para este término, dado que tanto los suplementos alimenticios, nutracéuticos y alimentos medicinales se utilizan como sinónimos. La Asociación Nutracéutica Europea (ENA, por sus siglas en inglés) define nutracéuticos como “productos nutricionales con efectos relevantes en la salud, a diferencia de los medicamentos estos son sustancias no sintéticas. Son productos que contienen nutrientes (en forma concentrada) y son asignados en la categoría de alimentos”. Por lo tanto esta definición no incluye compuestos no nutrientes como polifenoles y carotenoides, los cuales son comúnmente comercializados como nutracéuticos (ENA, 2013).

La Asociación Nutracéutica Americana define a un nutracéutico como cualquier sustancia que es un alimento o parte de un alimento y proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades. Estos productos pueden abarcar desde nutrientes aislados, suplementos alimenticios, alimentos genéticamente diseñados, productos herbales y alimentos procesados tales como cereales, sopas, y bebidas. Esta definición también incluye compuestos no nutritivos. Sin embargo la alusión directa de

alimento (cereales, sopas y bebidas) significa que el límite entre los conceptos alimento funcional y nutraceutico no está bien definido ([www.anajana.org](http://www.anajana.org)).

Esta definición se modificó por la Secretaría de Salud de Canadá: “Nutracéutico es un producto aislado o purificado de un alimento y generalmente vendido en forma medicinal y demuestra que tiene beneficio fisiológico o proporciona protección contra enfermedades crónicas”. En esta definición existe una diferencia clara entre alimento y nutraceutico, sin embargo no incluye que la dosis podría exceder a la que se obtiene de una dieta balanceada normal ([www.hc-sc.gc.ca](http://www.hc-sc.gc.ca))

La Autoridad Europea de Seguridad de Alimentos (EFSA, por sus siglas en ingles) no usa el término nutraceutico en relación a un concentrado de nutrientes o de otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico cuyo propósito es, ser un complemento de la dieta normal. Estos son comercializados en formas dosificadas, como tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos (Espin, 2007). Esta definición también incluye compuestos no nutrientes y no alimenticios de origen vegetal, como, ginseng, planta de San Juan, ginkgo biloba entre otros, que son comúnmente comercializados como nutraceuticos. La EFSA, considera a estos como compuestos “botánicos” (preparaciones hechas a base de plantas, algas, hongos) y no los considera estrictamente nutraceuticos debido a su origen no alimenticio (atendiendo a la etimología de la palabra “nutraceutico”)

En Estados Unidos de América el término nutraceutico es comúnmente usado, en mercadotecnia, pero su definición no está regulada. De acuerdo a la Administración para los Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), bajo la ley de Educación y Salud de Suplementos Alimenticios de 1994 (DSHEA, por sus siglas en ingles), solo considera suplementos alimenticios y controla a los fabricantes de éstos en cuanto a la seguridad de los mismos antes de sacarlos al mercado (<http://www.fda.gov>)

Por lo anterior se proponen requerimientos específicos para identificar un nutraceutico. Los suplementos alimenticios son productos que son consumidos para complementar la dieta. Se consumen en forma farmacéutica, como tabletas, píldoras, polvos etc. pero no en forma de bebidas, sopas o jugos etc. o en forma de

alimentos convencionales.

Los suplementos alimenticios pueden clasificarse según González- Sarrias (2013) en: **(i) Alimentos medicinales.**- Son suplementos con formulaciones que proveen requerimientos nutricionales específicos, comúnmente en pacientes bajo supervisión médica, por ejemplo, nutrimentos modificados para pacientes con cáncer, desórdenes metabólicos, etc., **(ii) Productos botánicos.**- Son suplementos dietarios de origen no alimenticio (plantas, algas, hongos, líquen). Un compendio de 900 productos botánicos han sido reportados que contienen sustancias de origen natural con posibles efectos benéficos a la salud humana cuando son usados en alimentos o suplementos (EFSA, 2012), **(iii) Nutracéuticos.**- Son un tipo de suplementos dietarios y no un valor o propiedad. Son productos que ofrecen un concentrado (extracto, compuestos purificados o combinaciones) de un agente bioactivo, nutrimento o no, pero de origen alimenticio (**nutra**) en una dosis que puede exceder la obtenida de un alimento en una dieta balanceada, son usados con el propósito de mejorar la salud (**céuticos**) y bienestar desde el punto de vista fisiológico y psicológico, con demandas específicas más allá de los requerimientos nutricionales convencionales (para la prevención, retraso y mejora de enfermedades o para complementar tratamientos farmacológicos bajo supervisión médica, pero no para curar patologías (González- Sarrias y col, 2013)

A los componentes o ingredientes fisiológicos activos presentes en los alimentos nutraceuticos se les denomina con el término de fitoquímicos (Dillard y Bruce, 2000). Cuando un fitoquímico se incluye en una formulación de alimentos se considera alimento funcional. Si el mismo fitoquímico está incluido en una cápsula este constituye un nutraceutico. (Espin, 2007). El número de fitoquímicos y de evidencias científicas acerca de ellos ha ido en aumento. Cada vez se reconoce más el efecto benéfico de algunos de ellos, como los presentes en la soya y, en los últimos años, del frijol común. Inclusive, compuestos presentes en estas leguminosas que históricamente se reconocieron como factores antinutricionales, están relacionados con la prevención o el tratamiento de ciertas

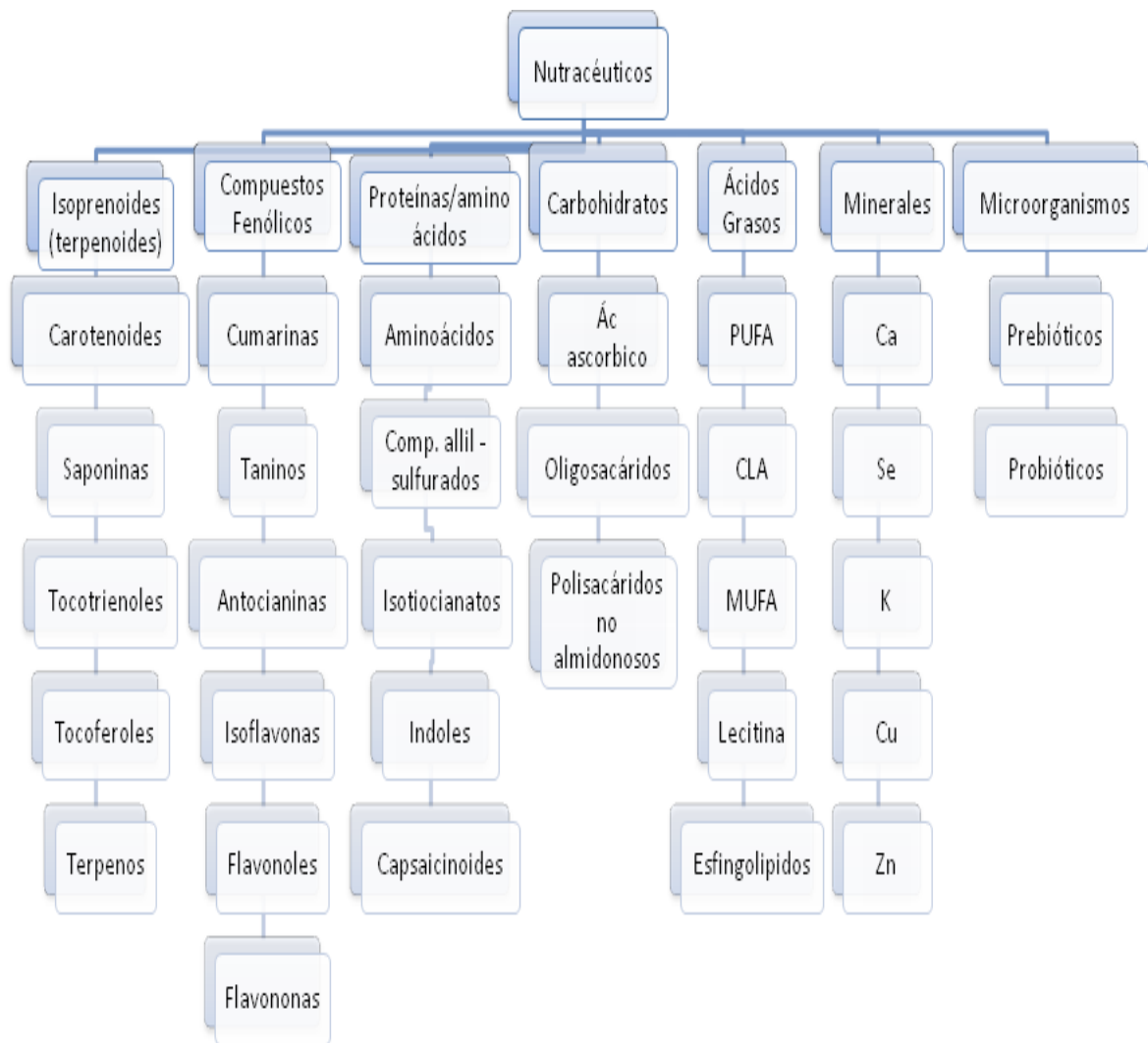
enfermedades (Guzmán-Maldonado y col, 2002). Son muchos y diferentes los compuestos que se investigan por su capacidad nutracéutica (**Fig 6**), específicamente por su actividad como anticarcinógenos, así como antioxidante. Entre los fitoquímicos más estudiados se encuentran: compuestos fenólicos (proantocianidinas, flavonoides, ácidos fenólicos), terpenos (carotenoides), tocoferoles, Calcio, clorofilina, fitatos, inulina, almidón resistente, tiocianatos e inhibidores de proteasas, entre otros (Chasquibol y col. 2003; Liu, 2004).

Una forma de clasificar a los nutracéuticos, independientemente de la fuente de alimento, es mediante su mecanismo de acción; es decir, en base a sus propiedades fisiológicas. Entre las clases de nutracéuticos según su mecanismo de acción destacan los antioxidantes, antibacterianos, antihipertensivos, antihipercolesterolémicos, antiinflamatorios, anticarcinogénicos, osteoprotectores entre otros. En el **Cuadro 1** se muestran ejemplos de esta clasificación, así mismo este modelo podría servir para desarrollar alimentos funcionales de acuerdo a las necesidades de cada persona tomando en cuenta su predisposición genética o bien alguna condición médica particular (Wildman, 2007).

### **3 Actividad antioxidante**

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrase, previene o elimine el daño oxidativo de una molécula diana (Halliwell, 2007). El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los antioxidantes se clasifican: **(i)** De acuerdo al sitio donde ejercen su acción, **(ii)** Según su origen (**Cuadros 2, 3**).

La actividad antioxidante se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto protector o preventivo sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Wang y col, 1996).



**Fig 6.** Esquema organizacional de nutraceuticos

**PUFA**= Ácidos grasos poliinsaturados, **CLA**= Ácido Linolénico conjugado,

**MUFA**= Ácidos grasos monoinsaturados

**Wildman (2007)**



**Cuadro 1.** Compuestos nutraceuticos agrupados por mecanismo de acción

Anticáncer	Influencia positiva en el perfil de lípidos	Antioxidante	Anti inflamatoria	Osteogénico o protector de huesos
Capsaicina	$\beta$ -glucanos	Ácido linoleico	Acido Linolénico	CLA
Genisteína	$\Gamma$ -tocotrienol	Ácido ascórbico	EPA	Proteína de soya
Diadzeína	$\delta$ - Tocotrienol	$\beta$ -caroteno	DHA	Genisteína
$\alpha$ - tocotrienol	Ácidos grasos Monoinsaturados	Polifenoles	GLA	Diadzeína
$\gamma$ -tocotrienol	Quercetina	Tocoferoles	Capsaicina	Calcio
CLA	$\omega$ -3 ácidos grasos poliinsaturados	Tocotrienoles	Quercetina	Fosfopéptidos
Lactobacilos acidófilos	Resveratrol	$\alpha$ - tocoferol	Cúrcuma	FOS
Esfingolípidos	Taninos	Ácido elágico		Inulina
Limoneno	$\beta$ -sitosterol	Licopeno		
Sulfuro de dialilo	Saponinas	Luteína		
Ajoeno	Pectinas	Glutación		
$\alpha$ -tocoferol		Hidroxitirosol		
Enterolactona		Luteolina		
Glicirricina		Catequinas		
Equol		Ácido clorogénico		
Cúrcuma		Taninos		
Ácido elágico		Gingerol		
Luteína		Oleurpeína		
Carnosol		Indol 3-carbinol		
Lactobulgáricos				

**CLA**= Ácido Linolénico conjugado; **EPA**= Ácido Eicosapentanoico; **DHA**= Ácido docosaheptanoico; **FOS**=Fructooligosacáridos; **GLA**= Ácido gama-linoleico. **Wildman (2007).**

**Cuadro 2.** Clasificación de antioxidantes según su sitio de acción

<b>Intracelular</b>	<b>Membrana</b>	<b>Extracelular</b>
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Acido úrico
Vitamina C		Vitamina E

**Venereo-Gutiérrez (2002)**

**Cuadro 3.** Clasificación de antioxidantes según su origen

<b>Origen</b>	<b>Acción</b>
<b><i>Exógenos</i></b>	
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singlete
	Captura radicales libres hidroxilo
	Captura O <sub>2</sub>
	Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Neutraliza el oxígeno singlete
	Captura radicales libres de hidroxilo
	Captura O <sub>2</sub>
	Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos	Neutraliza el oxígeno singlete
Flavonoides, licopenos	
<b><i>Endógenos</i></b>	
<b>Enzimáticos</b>	Cofactor
Superóxido dismutasa	Cobre, Sodio, Manganeso
Catalasa	Hierro
Glutación peroxidasa	Selenio
<b>No enzimáticos</b>	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
Coenzima Q	
Acido Tioctico	Transportadores de metales (Transferrina y Ceruloplasmina)

**Venereo-Gutiérrez (2002)**

Existen numerosos métodos para predecir la protección frente a la oxidación que se puede atribuir a los antioxidantes de un alimento, como la protección que ofrecen los antioxidantes fenólicos ampliamente distribuidos en las plantas y que tienen habilidad de atrapar radicales libres (Duval y col, 2001; Shetty y col, 2004). Un buen antioxidante no solo secuestra radicales libres también ejerce actividad antioxidante activando factores de transcripción para inducir la expresión de enzimas antioxidantes y aminorar el estrés oxidativo. Diferentes ensayos *in vitro* basados en métodos químicos han sido desarrollados para determinar la capacidad antioxidante de los productos naturales

Sin embargo, la información suministrada por estos métodos es, en ocasiones, cuestionada. Los modelos químicos *in vitro* deben interpretarse teniendo en cuenta todas sus limitaciones: medio de reacción, sustrato oxidable, radical, concentración de iniciador de la oxidación, etc. los resultados son indicadores pero no está completamente demostrado que se pueden extrapolar a las condiciones fisiológicas. No obstante, se consideran buenas herramientas para seleccionar extractos o sus fracciones con actividad antioxidante alta, principalmente por la rapidez, reproducibilidad y bajo costo de este tipo de métodos. Muchos de los estudios realizados *in vivo* en animales (ratas, ratones y conejos principalmente) se han interesado en las propiedades antioxidantes de los cereales, mostrando efectos positivos en algunos biomarcadores antioxidantes (Fardet y col, 2008).

#### **a Evaluación de la actividad antioxidante**

Los métodos para determinar la actividad antioxidante de los alimentos se basan en comprobar como un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra.

Los métodos basados en la determinación de productos secundarios de oxidación, parecen adecuados para el estudio de sistemas lipídicos, así como en lípidos aislados de su entorno biológico, como los microsomas o las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los tres métodos más comúnmente utilizados son el

método del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el índice de Anisidida para determinar aldehídos volátiles y la determinación por cromatografía de gases de los compuestos resultantes del proceso de oxidación, como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos de cadena corta e hidrocarburos. Por otra parte, se encuentran los métodos basados en la capacidad para reducir metales, esta capacidad para reducir un catión se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. Uno de los métodos basados en esta consideración es el ensayo FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (Ou y col 2001; Huang y col 2002; Soler, 2009).

Finalmente se encuentran métodos cuyo mecanismo más importante para prevenir la oxidación es el secuestro de radicales libres, dando por finalizada la cadena de oxidación. Consecuentemente, han sido propuestos numerosos métodos basados en incorporar al medio un radical, habitualmente una molécula estable comercial o un radical generado en el propio medio de reacción, y comprobar como le afecta la presencia de un antioxidante. Pertenecen a este grupo de métodos los ensayos 2,2 Difenil Picril Hidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés), capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) y capacidad absorbancia de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) (Ou y col 2001; Huang y col 2002; Soler, 2009).

En la actualidad el ensayo ORAC es uno de los más empleados y utiliza la fluorescencia como técnica instrumental. El método se basa en comparar la pérdida de fluorescencia que se produce cuando la Fluoresceína reacciona con un radical libre en presencia o ausencia de antioxidantes. Los antioxidantes presentes en el medio pueden reaccionar con el radical libre, neutralizando parte del daño al sustrato fluorescente; en consecuencia, anulando o retrasando la pérdida de fluorescencia. El método registra la fluorescencia a lo largo del tiempo y mediante la medida del área bajo la curva, convenientemente corregida con un blanco, se tiene la medida de la actividad antioxidante. Los resultados se expresan comparando las áreas de las curvas del antioxidante estudiado con las

correspondientes al antioxidante de referencia Trolox (Ou y col 2001; Huang y col 2002; Soler, 2009).

El método ORAC ha alcanzado una gran difusión debido a que ha sido adaptado a la medida en microplaca por lo que ha disminuido considerablemente el tiempo de análisis al poder determinar varias muestras a la vez. Además, el método ofrece una alternativa al problema de la solubilidad del antioxidante, ya que distingue entre ORAC lipofílico y ORAC hidrofílico, es decir, es posible asignar la actividad antioxidante a la fracción hidrofílica y/o lipofílica del alimento. Estas ventajas, unidas a que la Administración para los Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América publicó tablas de referencia de actividad ORAC en alimentos han hecho que sea uno de los métodos de mayor aplicación en la actualidad (Ou y col 2001; Huang y col 2002; Soler, 2009).

La evaluación de la actividad antioxidante ha tenido un interés creciente en los últimos años. La acción protectora de frutas y vegetales han sido atribuidas, especialmente, a vitaminas antioxidantes (ácido Ascórbico,  $\alpha$ -Tocoferol y  $\beta$ -Caroteno) (Gey y col, 1991; Willet, 1994; Kalt y Kushad, 2000; Prior y Cao, 2000). Sin embargo, numerosos estudios reportan una mayor actividad antioxidantes en compuestos como taninos, fenoles, flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, catequinas e isocatequinas que en vitaminas C, E y  $\beta$ -Caroteno (Wang y col, 1996; Kahkonen y col, 1999).

Amarowicz y Karame (2002) investigaron actividad antioxidante en lenteja; ellos reportaron que las semillas de lenteja germinada poseen capacidad para atrapar radicales peróxido mayor que semillas de soya germinada. Xu y Chang (2007) realizaron estudios en frijol, chícharo, lentejas y garbanzo y reportaron que la composición fenólica de los extractos hidrofílicos de las leguminosas está relacionada con su actividad antioxidante. Mora-Rochín y col (2010) estudiaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de tortillas producidas a partir de maíces pigmentados procesados por nixtamalización y por extrusión. Ellos reportaron que las tortillas preparadas con diferentes maíces

nixtamalizados y extrudidos contienen y retienen en proporciones diferentes compuestos fenólicos, ácido ferúlico, antocianinas y actividad antioxidante. Ambos procesos promovieron pérdidas de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante pero la extrusión produjo, significativamente, menos pérdida.

#### **b Actividad antioxidante celular (AAC)**

En la actualidad se ha evaluado la actividad antioxidante a nivel celular, mediante el uso de líneas celulares como la de hepatocarcinoma humano HepG2. El principio de este ensayo biológico se basa en la absorción celular de la DCFH-DA (Diacetato de Diclorofluoresceína) y la formación de DCFH (Diclorofluoresceína) una vez que esta difunde a través de la membrana celular. Dentro de la célula es deacetilada por medio de la hidrólisis de esterasas endógenas. DCFH es atrapada dentro de la célula debido a su naturaleza polar y puede ser fácilmente oxidada mediante la degradación térmica del generador de radicales libres (AAPH) y transformada al compuesto fluorescente DCF (Diclorofluoresceína). El ensayo mide intensidad de fluorescencia (485 nm de excitación; y 535 nm de emisión), es por ello que la habilidad de los compuestos antioxidantes para prevenir la oxidación de la molécula (inhibición de la fluorescencia) es usada como una medida de la capacidad antioxidante presente en los compuestos de la muestra expresada como  $\mu\text{M}$  equivalentes de Quercetina.

El método de AAC representa la complejidad de los sistemas biológicos más que los ensayos químicos que miden la actividad antioxidante debido a que toma en cuenta aspectos importantes como la biodisponibilidad, absorción y metabolismo de los compuestos con actividad antioxidante y, por lo tanto, es una herramienta importante para seleccionar alimentos, fitoquímicos o suplementos alimenticios con potencial antioxidante (Wolfe y Liu, 2007).

La AAC de distintos alimentos ha sido evaluada anteriormente. Un amplio estudio hecho en diversos vegetales consumidos en la dieta diaria, reportó una concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de la AAC de 19 hasta 1,265 mg/mL (protocolo sin lavado con PBS) y de 115 hasta 800 mg/ml (protocolo con lavado de

PBS), concluyendo que un incremento en el consumo de frutas y vegetales puede disminuir el estrés oxidativo y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Song y col, 2010). Por otra parte se ha reportado variaciones importantes en cuanto a contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante celular en 11 variedades de lentejas, con una EC<sub>50</sub> en un rango de 0.33 a 1.44 mg/ml. Así mismo indican que existe una correlación significativa entre la actividad antioxidante celular y la actividad antioxidante medida por el método de ORAC (Xu y col, 2010).

## **E LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA**

### **1 Importancia**

Dentro de las plantas utilizadas en la alimentación, las leguminosas son quizás una de las más interesantes. El cultivo de las leguminosas se considera muy deseable por el beneficio que la fijación de nitrógeno atmosférico, característico de estas plantas, tiene sobre la productividad del suelo, permitiendo reducir también el uso de fertilizantes químicos con el consiguiente efecto positivo desde el punto de vista ecológico. La presencia simultánea de proteína y almidón en proporciones adecuadas, así como la riqueza en vitaminas, minerales, etc. las han hecho acreedoras de un justificado interés desde el punto de vista nutricional (Muzquiz y col, 2000). De más de 1,300 especies de leguminosas, solo alrededor de 20 se desarrollan comúnmente en diferentes partes del mundo y son usadas para el consumo humano. Las principales leguminosas son: Frijol, chícharo, garbanzo, habas y lenteja (FAO, 2013).

### **2 Procesamiento de leguminosas**

Las leguminosas son procesadas para su consumo aplicando diversas tecnologías como descascarillado, molienda, remojo, cocción, enlatado, extrusión, tostado, horneado, freído, fermentación y germinación.

#### **a Remojo**



El remojo de los granos es una práctica común, utilizada generalmente antes del cocimiento, tanto en la industria como en el hogar. Este permite que las semillas ganen peso y volumen, suavizando la textura y acelerando el proceso de cocción (Wah y col, 1997). Una rápida hidratación con la máxima ganancia de peso y/o volumen son características deseables de este proceso (Wood y Harden, 2006). El proceso para la absorción de agua inicial es más rápido a través del hilio y micrópilo de la testa de las semillas; después de 30 - 60 min de remojo se establece en la testa de la semilla la ruta principal para la absorción de agua y el proceso de absorción de agua fluye rápidamente (Deshpande y Cheryan, 1986).

El medio de remojo incluye agua, sal o combinación de sales. Durante el remojo de leguminosas existe una importante disminución de algunos factores antinutricionales, como ácido fítico, taninos, fenólicos, inhibidores de tripsina y de  $\alpha$ -amilasa (Abd El-Hady y Habiba, 2003). Durante el remojo de garbanzo se ha reportado una disminución de polifenoles (19.5%) y taninos (22.1%) (Khandelwal y col, 2010); de inhibidores de tripsina de (19.9%) y en el contenido de ácido fítico (Abd El-Hady y Habiba, 2003), así como de vitaminas y minerales solubles en agua (Deshpande y Damodaran, 1990). El remojo en soluciones salinas mejora el valor nutricional y las características funcionales, fisicoquímicas y sensoriales de granos de garbanzo y disminuye el tiempo de cocción (Coskuner y Karababa, 2003). El resultado obtenido depende de factores como género, especie y variedad del grano, la duración del proceso, temperatura, pH, salinidad del medio de remojo, así como las condiciones de almacenamiento de los granos antes del procesamiento (Prodanov y col, 2004).

## **b Cocción**

La cocción es probablemente el procedimiento más antiguo de procesamiento. Durante la cocción, el estrés mecánico, ocasionado por la gelatinización del almidón, desnaturalización de la proteína y la convección del calor, facilita la separación celular y el desarrollo de una textura suave y uniforme en semillas cocidas (Deshpande y Damodaran, 1990). Sin embargo, tiempos de cocción

prolongados reducen el valor nutricional de las leguminosas, así como el nivel de algunos aminoácidos esenciales (Youssef y col, 1986).

La cocción incrementa significativamente el contenido de almidón resistente, por otra parte, disminuye los niveles de Potasio, Magnesio, actividad inhibidora de Tripsina, taninos y el contenido de oligosacáridos (Wang y col, 2010). Diversas investigaciones han estudiado los tiempos de cocción de granos de garbanzo, tanto fresco como endurecido. Reyes-Moreno y col (2001) reportaron tiempos de cocción de 112-142 min para granos enteros de garbanzo fresco, tipo kabuli; estos valores son más altos que los reportados para granos de frijol común (59-90 min) (Reyes-Moreno y col, 1994) y menores que los reportados para granos de garbanzo kabulli endurecido (213 min).

Para determinar el tiempo de cocción de los granos de garbanzo Reyes-Moreno y col (2001), utilizaron un cocedor Mattson modificado, de acero inoxidable, que consta de tres platillos de acero inoxidable (cada uno con 25 perforaciones), soportado por tres varillas y nueve tornillos (3 en cada plato) para definir una estructura cilíndrica; el cocedor está equipado con 25 agujas de acero inoxidable (diámetro de punta = 2mm) las cuales se colocan sobre 25 semillas previamente acomodados sobre cada uno de los orificios del plato inferior. El cocedor Mattson, con los 25 granos y sobre ellos las 25 agujas, se introducen en un vaso de acero inoxidable que contiene suficiente agua destilada en ebullición para cubrir totalmente los granos. El tiempo de cocción se define como el tiempo necesario para que 15 de las 25 semillas pueden ser atravesadas por las agujas del cocedor, lo que indica la cocción de al menos el 60 % de las semillas.

### **c Extrusión**

La aplicación de esta tecnología para el procesamiento de cereales y leguminosas, o sus mezclas, permite obtener una gran cantidad de productos con nuevas formas y texturas, con una mínima degradación de nutrimentos y una mejora sustancial en la digestibilidad y valor biológico de las proteínas (Mercier, 1993). La extrusión es un tratamiento térmico que se lleva a cabo a temperaturas

altas durante un periodo corto de tiempo y es uno de los procesos industriales más comunes para obtener productos alimenticios a partir de cereales y leguminosas (Delahaye y col, 1997; Hurtado y col, 2001; Milán-Carrillo y col, 2002; Alarcón-Valdez y col, 2005).

La extrusión se ha convertido en una importante herramienta para procesar alimentos y mejorar su digestibilidad y otros aspectos nutricionales. La popularidad de que goza actualmente la operación unitaria de extrusión se debe principalmente a cuatro razones: **(i) Versatilidad:** Cambiando pequeñas proporciones de ingredientes minoritarios y las condiciones de operación puede obtenerse una gran variedad de productos, **(ii) Flexibilidad :** El proceso permite acomodarse a variaciones en la demanda por parte del consumidor, **(iii) Proceso económico :** La operación de extrusión resulta más barata y productiva que otros procesos de cocción y moldeo, **(iv) Automatización:** procesos de gran capacidad de producción, además de que no genera efluentes (Milán-Carrillo y col, 2007).

Con respecto al efecto de la extrusión sobre la composición química de la materia prima existen diversos reportes que indican que la extrusión modifica la estructura nativa de las macromoléculas por gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas (Mitchell y Areas, 1992), la formación de moléculas complejas como amilosa-lípidos, lípidos-proteínas y proteínas-proteínas (Ho e Izzo, 1992), formación de enlaces cruzados intermoleculares, que da como resultado una estructura expandible y con cierta estabilidad y la formación de almidón resistente (Unlu y Faller, 1998). Así mismo se mejora significativamente la digestibilidad proteínica *in vitro* (21.7%) y la relación de eficiencia proteínica (36.9%) de harinas de garbanzo (Milán-Carrillo y col, 2000).

### **3 Germinación de leguminosas**

Además de los procesos mencionados, para la preparación de leguminosas se aplican algunos bioprocesos, como fermentación en estado sólido (FES) y germinación, los cuales son simples, efectivos y económicos; a través de ellos es posible mejorar el valor nutricional / nutracéutico de leguminosas. La FES y la

germinación son tecnologías que ahorran tiempo, energía y combustibles y generan ingredientes potenciales para la formulación de nuevos alimentos funcionales (Fernández Orozco y col, 2009; Silva y col, 2013; Rochín-Medina y col, 2015).

La germinación es un bioproceso durante el cual la semilla se recupera rápidamente del proceso de maduración y secado, reanudando intensamente el metabolismo, completando eventos celulares esenciales para permitir que el embrión emerja y se favorezca, subsecuentemente, el crecimiento de la plántula. La germinación de leguminosas causa cambios significativos en las características bioquímicas de las semillas. Los germinados son ricos en fitoquímicos comparados con su contraparte sin procesar.

La germinación es un bioprocésamiento que se aplica para producir brotes o germinados con el potencial para incrementar el valor nutricional y propiedades nutraceuticas de los de los granos (Urbano y col, 2005; Nonogaki, 2010; Vernaza y col. 2012).

#### **a Factores que afectan la germinación**

Entre los factores que afectan la germinación de las semillas se encuentran tiempo de remojo, temperatura, humedad y tiempo de germinación, iluminación, hormonas, así como variedad, localidad de siembra y prácticas culturales (Paucar-Menacho y col, 2010).

#### **1) Temperatura / tiempo / iluminación**

Khattak y col (2008) reportaron que el tiempo y tipo de iluminación tienen efecto significativo en el contenido de carotenoides, solubilidad y digestibilidad proteínica *in vitro* en garbanzo germinado, siendo la luz amarilla y un tiempo de 72 h las condiciones que favorecieron la obtención de germinados con mayor contenido de  $\beta$ -caroteno que la semilla cruda. En cuanto a la solubilidad de proteínas esta fue mayor en presencia de luz verde y de radiación gama a un tiempo de 120 h, lo mismo para la digestibilidad proteínica *in vitro* a 96 h.

Concluyeron que la radiación de garbanzo antes de la germinación mejora el contenido de  $\beta$ -caroteno, solubilidad y digestibilidad proteínica *in vitro*.

Bains y col (2011) optimizaron el tiempo de germinación y los tratamientos térmicos posteriores con el propósito de incrementar la disponibilidad de hierro proveniente de germinados de leguminosas (frijol mungo, garbanzo, frijol caupí). Los granos se germinaron por tres periodos de tiempo seguidos por cocción de los germinados mediante dos métodos [cocción a presión (15 psi), cocción con microondas (800W)]. 100 gramos de semillas crudas (frijol mungo, garbanzo, frijol caupí) se remojaron por 10, 12 y 8 h antes de ser sometidos a germinación (25°C/HR=70%) por tres periodos de tiempo: Frijol mungo (12, 16, 20 h), garbanzo (36, 48, 60 h), frijol caupí (16, 20, 24 h). Lotes de 250 g de germinados de cada leguminosa se sujetaron a dos tratamientos hidrotérmicos [Cocción a presión (15 psi) / Cocción en microondas (800 W)]. Los tiempos de cocción para frijol mungo y frijol caupí fueron de 1 y 7 min para cocción a presión y cocción en microondas, respectivamente. Para garbanzo los tiempos fueron de 5 y 15 min para cocción a presión y cocción en microondas, respectivamente. Se concluyó que los tiempos de germinación mayores (Frijol mungo 20 h / Garbanzo 60 h / Frijol caupí 24 h) seguido por cocción a presión por tiempo optimizado (Frijol mungo 1 min / Garbanzo 5 min / Frijol caupí 1 min) fueron las mejores combinaciones para obtener la biodisponibilidad mayor de hierro.

## **2) Hormonas**

Algunas fitohormonas, como el ácido Abscísico (ABA, por sus siglas en inglés), un sesquiterpeno resultante de la escisión de carotenoides, controlan el almacenamiento de reservas de la semilla, la acumulación de las mismas y la tolerancia a la desecación de las semillas (Nambara y col, 2010). En particular, ABA induce la expresión de proteínas de embriogénesis tardía, que se vuelven abundantes durante la maduración de la semilla. Durante la maduración de la semilla ABA también ejerce un efecto inhibitor sobre mecanismos de activación de la germinación precoz la cual es perjudicial para el desarrollo de las semillas de

la planta madre, permitiendo de ese modo la maduración de la semilla dotada de las reservas necesarias para el establecimiento de una plántula vigorosa después de la germinación. Por lo tanto, para germinar con éxito tras la imbibición de la semilla es necesario contrarrestar el efecto inhibitorio de ABA; una semilla no dormante debe establecer un catabolismo específico, disminuir la sensibilidad e inhibir la biosíntesis para reducir el nivel activo de esta hormona y sintetizar otra clase de hormonas representadas por una larga familia de diterpenos tetracíclicos como las Giberelinas, las cuales son activadores esenciales de la germinación (Sun y col, 2004). Las Giberelinas regulan negativamente las proteínas con comportamiento represor de la germinación, por lo que la relación ABA/Giberelinas resulta importante en la transición metabólica necesaria para la germinación (Yamaguchi, 2008; Nambara y col, 2010).

### **3) Metales**

Durante la germinación en presencia de metales ocurren importantes cambios moleculares y bioquímicos. Kranner y col (2011) reportaron que aunque la testa provee cierta protección hacia el estrés producido por la presencia de metales antes de la germinación, ésta se ve afectada de manera dependiente de la concentración. La germinación de la semilla es afectada por los metales en dos formas, primero por su toxicidad general y en segundo por su efecto en la inhibición de la absorción de agua, por lo que causa la reducción de la germinación de manera dependiente de la concentración de metales.

Li y col (2005) investigaron el efecto de metales esenciales (Cu, Zn) y no esenciales (Hg, Pb, Cd) en la germinación de semillas de *Arabidopsis* en concentraciones a nivel milimolar, mostrando una correlación negativa entre la concentración y la germinación total. Algunos estudios han mostrado que tanto el Cd como el Cu pueden inhibir la absorción de agua de las semillas lo cual, impacta de manera potencial en la germinación de las mismas (Kranner y col, 2011).

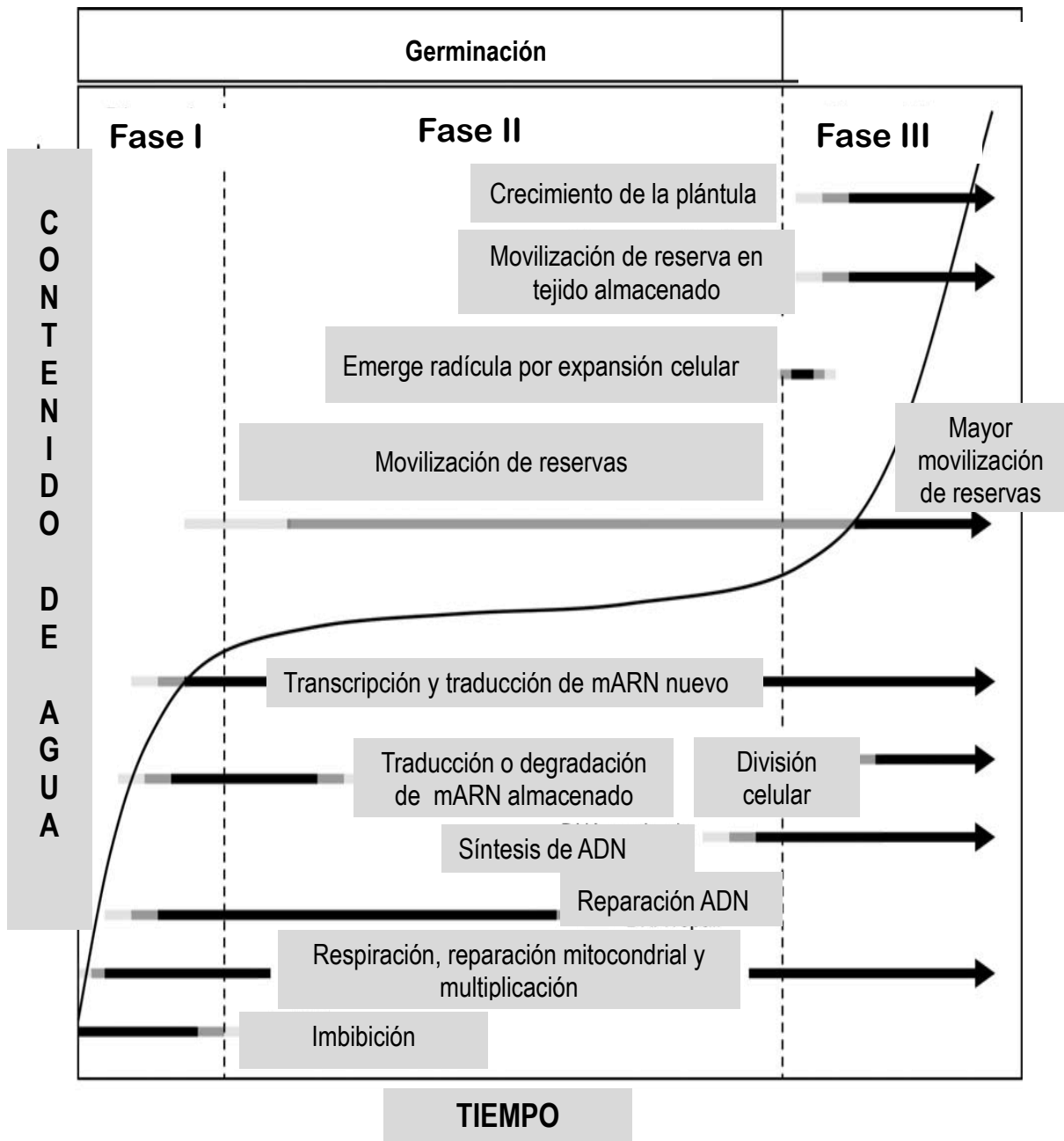
## **4 Etapas de la germinación**

Las etapas de germinación de una semilla involucran rehidratación, utilización de reservas y formación de las estructuras de síntesis que permitirán a la plántula asumir un modo autótrofo de existencia (Kermode, 1990; King, 1991). En términos bioquímicos la germinación es el resultado de procesos catabólicos y anabólicos contrastantes. Los primeros ocurren en los órganos de almacenamiento (endospermo en plantas monocotiledóneas y cotiledones en dicotiledóneas) y consisten en la degradación y movilización de las macromoléculas de reserva. Los segundos se efectúan en los ejes embrionarios e incluyen la síntesis de macromoléculas, componentes estructurales como membranas y paredes celulares, para generar nuevas células y tejidos durante el crecimiento (Kermode, 1990).

En la **Fig 7** se muestra una representación del progreso de germinación. Inicialmente se lleva a cabo una rápida imbibición de agua por la semilla seca (**Fase I**) hasta que las matrices y el contenido de la célula están completamente hidratados. Esto es seguido por un periodo de absorción de agua limitada (**Fase II**), en el cual la semilla permanece sin cambio. El incremento de la absorción de agua asociado con la **Fase III** es inicialmente relacionada con la terminación de la germinación. El ligero incremento en el contenido de agua seguido por una larga absorción de las células de crecimiento de la radícula y subsecuentemente el resto de la plántula, incrementa debido a división mitótica y expansión celular (Nonogaki, 2010).

### **a Imbibición**

Las semillas son metabólicamente inactivas (quiescentes) cuando están en su estado maduro y seco, aunque son capaces de sufrir diversos cambios químicos y fisiológicos cuando se exponen a concentraciones bajas (7-14%) de agua; la consecuencia de estos cambios puede derivar en cambios en capacidad para germinar por liberación de la dormancia (o bien puede causar deterioro en su capacidad y pérdida de viabilidad (Russel y col, 2000; Holdsworth y col, 2008; Nonogaki y col, 2010).



**Fig 7.** Cambios físicos y metabólicos ocurridos durante la germinación  
Nonogaki (2010)



La rehidratación de la semilla a través de la imbibición es una de las fases bioquímicamente esenciales para que inicie el proceso de germinación. Inicialmente la imbibición resulta de un incremento en la hidratación de matrices, como lo son la pared celular y la reserva de polímeros dentro de las células. La captación de agua generalmente es un proceso trifásico que se caracteriza por un periodo inicial de ganancia en peso, seguido de una fase estacionaria con un subsecuente incremento que coincide con el crecimiento de la radícula. Este proceso se puede llevar a cabo en algunas horas hasta varios días (Meredith y Pomeranz, 1985; Fincher, 1989; Nonogaki, 2010).

La semilla seca absorbe agua rápidamente. La cinética de absorción está influenciada por la estructura de la semilla, tamaño, permeabilidad de la cubierta, cantidad y disponibilidad de agua de manera equitativa en la semilla. En la **Fig 7** se observa un incremento en la absorción de agua con respecto al tiempo, esto es debido a un aumento en el número de células dentro de la semilla que empieza a hidratarse, más que como resultado de la hidratación de todas las células uniformemente. El agua se absorbe a través de los orificios naturales en la cubierta, difundiéndose a lo largo de los tejidos; esto ocasiona un incremento en el volumen de las células y de la semilla. Los cuerpos proteínicos del endospermo sufren alargamiento e hinchamiento. De los componentes del endospermo las proteínas son las que absorben agua en mayor proporción. Una máxima absorción de agua es deseable; sin embargo, una absorción excesiva puede romper la cubierta de la semilla y afectar la germinación puesto que las sustancias celulares van hacia el exterior ocasionando: **(i) Pérdidas de reservas**, **(ii) Pérdida de la compartamentalización** con mezclas indeseables de sustancias (p. ej. energía celular en forma de ATP que puede ser degradado por ATPasa) y **(iii) Estímulo a la actividad de patógenos** del ambiente (Chavan y Kadam, 1989; Nonogaki, 2008, 2010).

## **b Reanudación del metabolismo energético y reparación celular**

Mientras que la absorción de agua es rápida, la reanudación del metabolismo es gradual y ocurre de manera temprana durante la **Fase I**. Las semillas contienen mitocondrias pobremente diferenciadas dentro de la membrana. Las enzimas funcionales necesarias para la respiración como son las del ciclo de Krebs y terminal oxidasas, proveen energía en forma de ATP para la fosforilación oxidativa algunas horas después de iniciada la imbibición (HAI, por sus siglas en inglés) (Hourmant y col, 1981). Estas enzimas protegen a la semilla seca de las abundantes proteínas embriogénicas tardías mitocondria específicas (Grelet y col, 2005; Tolleter y col, 2007). La oxidación mitocondrial incrementa hasta terminar la imbibición durante la **Fase II** donde la mitocondria sufre reparación y replicación. Hay dos distintos patrones de desarrollo mitocondrial: **(i)** Semillas que almacenan almidón como chícharo y frijoles mungo y caupí, sufren una reparación y reactivación de las preexistentes, o bien **(ii)** Mediante la biogénesis de nuevas mitocondrias lo cual es típico de las semillas que almacenan aceites como el cacahuate, frijol castor y calabaza (Morohashi y col, 1980, 1986).

La ruta de las pentosas y la glicólisis están activas durante la imbibición, muchas semillas experimentan condiciones anaeróbicas durante o después de la imbibición produciendo etanol (Kennedy y col, 1992). La ruta glucolítica predomina cuando la producción mitocondrial de ATP es restringida por una disponibilidad baja de oxígeno, debido a la permeabilidad limitada de las estructuras circundantes del embrión. En contraste cuando la mitocondria se activa también se activa la ruta de las pentosas (Roberts, 1964a,b).

Compuestos que contienen nitrógeno como nitrato o nitritos liberan a la semilla de la dormancia, hipotéticamente actúan como aceptores de electrones, afectando la velocidad de transporte de electrones, o por causa de la oxidación de NADPH y eso permite un gran flujo de carbono a través de la Ruta de las Pentosas (Roberts y col, 1979). La efectividad del nitrato en la promoción de la germinación es ejecutada a través de su reducción a nitrito, hidroxilamina, o ácido nítrico (Hendricks y col, 1974; Hilhorst y col, 1989). El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) es reconocido como un importante componente en señalización celular y

podría acelerar el flujo metabólico a través de la ruta de las pentosas por un incremento indirecto de la oxidación de NADPH aunque este podría estimular la germinación a través de otras rutas en las que participan hormonas; por ejemplo, el NO promueve la síntesis de giberelinas en *Arabidopsis*, el nitrato podría actuar desactivando el ácido Abscísico (Bethke y col, 2007a,b; Matakias y col, 2009).

Durante la imbibición se cambia la estructura celular que antes se mantenía como un gel a un líquido cristalino. Algunas membranas son dañadas durante esa transición lo cual resulta en la pérdida de solutos. El daño a la proteína podría ocurrir debido a la formación de aminoácidos anormales durante el almacenamiento, esto causa malformación, reducción o pérdida de la función de la proteína (Copeland y col, 1985; Crowe y col, 1989; Nonogaki, 2010).

Semillas embebidas generan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) durante la absorción de agua, aunque de manera positiva, los ROS actúan en la liberación de la dormancia, por otra parte, en semillas no dormantes, los radicales libres podrían dañar las proteínas y otros componentes celulares. Semillas de chícharo contienen dehidroascorbato reductasa, superóxido dismutasa, catalasa ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa los cuales forman parte del complejo antioxidante de la semilla y se involucran en el barrido de radicales libres generados durante la imbibición, reparando y protegiendo proteínas así como otros compuestos celulares (Schopfer, 2001; Wojtyła y col, 2006; Oracz y col, 2007, 2009).

### **c Síntesis de proteínas**

Las semillas, secas o no, son capaces de transcribir ADN y sintetizar proteínas. Una transcripción y traducción baja puede ocurrir en semillas con hidratación baja. Los mRNA son llamados de almacén o de mensaje residual los cuales sobreviven al secado (Ishibashi y col, 1990; Leubner, 2005). Muchos de los genes que codifican para mRNA residual contienen elementos de respuesta para ácido Abscísico con la secuencia ACGT en su región promotora y son activados durante la maduración de la semilla. Es posible que el mRNA almacenado sea el soporte

para la síntesis de proteínas de *novo*, antes que la actividad transcripcional continúe y nuevos mensajes sean disponibles durante estados tempranos de imbibición. En semillas secas, todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas deben estar presentes (Bewley y col, 1994; Marcus y col, 1966; Nakabayashi y col, 2005). A pocos minutos de la rehidratación los ribosomas llegan al complejo de síntesis de proteínas polisomal utilizando el mRNA existente. La participación del mRNA almacenado durante la germinación es soportado por estudios hechos en *Arabidopsis* en los cuales se utilizan inhibidores transcripcionales y transduccionales; por ejemplo, Amanitina un inhibidor de la RNA polimerasa II no inhibe la germinación, mientras que Cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas que impide claramente que emerja la radícula. Estas observaciones permiten suponer que la síntesis de *novo* de las proteínas utilizando solamente mRNA es suficiente para permitir la germinación. Aunque el mRNA almacenado podría ser utilizado durante la imbibición temprana, se desconoce si son esenciales para la terminación del proceso de germinación (Rajjou y col, 2004; Nonogaki, 2010).

Durante la **Fase I** se observa una hinchazón de la semilla y ocurre tanto en semillas dormantes como no dormantes y cesa alrededor de las 3 h de imbibición de las semillas (3h HAI). Muchos de los genes que regulan alrededor de las 3h HAI están relacionados con metabolismo primario, incluyendo ruta de las pentosas (lo que aporta evidencia de que la reanudación de la actividad respiratoria es una de las primeras en ser iniciadas después de la absorción de agua (Preston y col, 2009). Genes que codifican para proteínas ribosomales son regulados exclusivamente en semillas no dormantes (Preston y col, 2009) sugiriendo que la biogénesis de ribosomas es un paso necesario para la terminación de la germinación. Estudios bioinformáticos realizados en germinación de *Arabidopsis* identificaron genes que codifican proteínas ribosomales y que son expresados a las 3 h de iniciada la imbibición. Las semillas que presentan una mutación muestran un retraso en la terminación de la germinación y una hipersensibilidad al aplicar ácido Abscísico. Así, el establecimiento y reposición de los componentes

esenciales para sintetizar proteínas es un evento clave durante la germinación (Tatematsu y col, 2008; Preston y col, 2009; Nonogaki, 2010).

Durante la primera HAI suceden cambios predominantes en el metabolismo de carbohidratos, hay un incremento inmediato en la actividad de glucólisis y ciclo de Krebs para facilitar el proceso de demanda de energía. El análisis de metaboloma y transcriptoma combinados identifica un periodo de entre 0-1 y 1-3 HAI indicando un cambio en la actividad durante la imbibición. La regulación a la baja de transcritos también tienen importancia durante la germinación. Algunos genes codifican proteínas que inhiben la germinación como genes de respuesta a ácido Abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) ABI4, ABI5, ABI18 y receptores de GA (Giberelinas GID1A que regulan la germinación de semillas de *Arabidopsis*). La regulación de la germinación puede requerir ambos, la remoción selectiva de algunos transcritos y la síntesis de *novo* de otros (Bassel y col, 2008; Howell y col, 2009).

#### **d Metabolismo de hormonas**

Las hormonas tienen una función primordial en la regulación de la germinación y dormancia de la semilla, genes que codifican proteínas para modular el metabolismo de moléculas de señalización (especialmente los involucrados en la biosíntesis e inactivación de GA y ABA principales reguladores genéticos de estos eventos). Muchos de los transcritos que codifican enzimas que participan en el metabolismo hormonal son producidos por transcripción de *novo* durante la germinación en *Arabidopsis*, la síntesis de GA es necesaria para la germinación de semillas de *Arabidopsis*; las enzimas que catalizan la conversión de formas inactivas a su forma activa juegan un rol importante en la prevención de la germinación durante el desarrollo de la semilla por la remoción de la forma activa de GA. Otros genes codifican para enzimas que catalizan procesos limitantes durante la biosíntesis de ABA desactivando ó disminuyendo su concentración. Se ha evidenciado una correlación entre la disminución de ABA y la habilidad de la semilla para germinar (Varbanosa y col, 2007; Seo y col, 2009; Nonogaki, 2010).

Cuando la semilla embebe a temperaturas más altas de la óptima los eventos metabólicos entran en **Fase I y 2** pero no alcanzan a llegar a la **Fase 3**, por ejemplo la profusión de la radícula no ocurre (termoinhibición). Diversos estudios indican que las temperaturas altas estimulan la biosíntesis de ABA y reprimen síntesis de GA. La semilla responde a factores ambientales como el frío, la luz, nutrimentos, lo que explica cambios en metabolismo hormonal (Yamaguchi y col, 2004, 2007; Toh y col, 2008; Seo y col, 2009).

#### **e Cambios en el embrión**

Después de la absorción de agua inicial (imbibición, **Fase I**), hay un pequeño incremento en la **Fase II**, lo cual ocurre cuando se da una integración entre el medio ambiente y el estado fisiológico de la semilla para determinar si avanza o no a la **Fase III**. En la fase final hay un incremento en la absorción de agua derivando en una expansión celular y la terminación del proceso de germinación. Aunque la transición de la **Fase II** a la **III** es desconocida se sabe que las GA juegan un rol importante al menos en la semilla intacta; una semilla incapaz de producir GA no termina la germinación. Si el embrión está aislado de su estructura circundante no necesita GA, a diferencia de la semilla intacta la cual las necesita quizá para superar restricciones mecánicas u otras inhibiciones impuestas por la estructura circundante (Nonogaki, 2010). Para que se complete la germinación es necesario disminuir las fuerzas de restricción de la pared celular y un aumento en la turgencia celular (presión) que permite el crecimiento del volumen celular debido al incremento de la absorción de agua (inicio de la **Fase III**). El proceso final de germinación es el resultado de la elongación celular y no de la división celular y es reforzado por la observación de que la radícula emerge en semillas de *Medicago truncatula* en presencia de Oryzalina, un compuesto que rompe el citoesqueleto e inhibe la mitosis (Gimeno y col, 2009; Sliwinska y col, 2009).

#### **f Relación entre el embrión y su estructura circundante**

Al final de la **Fase II** emerge la radícula indicando la terminación de la germinación, para lograr esto se rompen los tejidos circundantes, endospermo y perispermo, y la testa. En algunas especies estas son barreras para emerger, imponiendo dormancia. En otras, como las leguminosas el endospermo es impenetrable, en la región alrededor del cotiledón, por la gruesa pared celular, células adyacentes a la radícula tienen paredes delgadas permitiendo la penetración y por lo tanto la germinación se completa. En todas las semillas que pueden penetrar por las estructuras circundantes el potencial de crecimiento del embrión deberá ser mayor que la resistencia mecánica de los tejidos (Williams y col, 2001; Gong y col, 2005; Nonogaki y col, 2007)

## **5 Efecto de la germinación de leguminosas sobre composición química y valor nutricional**

La germinación causa cambios importantes en las características bioquímicas, nutricionales y sensoriales en leguminosas. Se presenta un extenso rompimiento de compuestos en la semilla (almacén de reserva) y una síntesis de proteínas estructurales y otros compuestos celulares tienen lugar durante el bioproceso, resultando un incremento en el contenido de aminoácidos, que soportan la síntesis de proteínas y el desarrollo de la planta. Proteínas de almacenamiento sufren de proteólisis lo que contribuye al aumento de aminoácidos libres (Martínez-Villaluenga, 2006).

Ahmadzadeh y col (2007) estudiaron el efecto de la germinación de varias leguminosas (frijol mungo, frijol caupí, lenteja, garbanzo) sobre composición química, disponibilidad de hierro y digestibilidad proteínica y de almidón *in vitro*; ellos reportaron que la germinación generó, en todas las leguminosas estudiadas, incrementos en los contenidos de proteínas (+ 6.1-9.7%), Tiamina (+ 8-33%), digestibilidad proteínica *in vitro* (+ 14-18%) y digestibilidad de almidón *in vitro* (+53-82%).

Sangronis y col (2007) estudiaron el efecto de la germinación de frijoles negro, blanco y tipo gandul sobre el contenido de ácido Ascórbico, Tiamina (vit B<sub>1</sub>), Ca,

Zn, Fe. Ellos observaron que, en todos los genotipos de frijol, se incrementaron los contenidos de ácido Ascórbico (Negro: +33%, Blanco: +300%, Gandul: +208%) y Tiamina (Negro: +26%, Blanco: +12.8%, Gandul: +7.4%), Ca (Negro: +5%, Blanco: +8%, Gandul: +17%) y Zn (Negro: +200%, Blanco: +128%, Gandul: +37.7%) mientras que los niveles de Fe disminuyeron (Negro: -42.6%, Blanco: -78.3%, Gandul: -82.6%).

Huang y col (2014) reportaron, al segundo día de germinación, incrementos en el contenido de ácido Ascórbico de soya (de 5.2 a 5.9  $\mu\text{g/g}$ ) y frijol mungo (de 33.4 a 47.9  $\mu\text{g/g}$ ); sin embargo, al tercer día de germinación se observó una disminución en el contenido de esta vitamina en ambas leguminosas.

## **6 Efecto de la germinación de leguminosas sobre fitoquímicos y propiedades nutraceuticas**

Las germinados contienen cantidades significativas de polifenoles con propiedades terapéuticas. Germinados de semillas como la lenteja contienen compuestos bioactivos promotores de salud, y su consumo está ligado a la disminución en la incidencia de algunas enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, inflamación y cáncer (Losso, 2003; Caccialupi y col, 2010; Swieca y col, 2013). Los efectos de la germinación y las condiciones de germinación (temperatura, luz, humedad y tiempo) sobre los compuestos bioactivos pueden variar enormemente con la especie vegetal y variedad (Wuebker y col, 2001; Egli y col, 2005). Ver **Cuadro 4**.

Fernández Orozco y col (2006) reportan que la germinación de frijol lupino provee mayor cantidad de vitamina C, vitamina E y polifenoles comparados con sus semillas crudas y que la gran cantidad de compuestos bioactivos se encontraron después de 6 días de germinación.

Paucar-Menacho y col (2010) estudiaron el efecto del tiempo y la temperatura de germinación sobre la concentración de proteína soluble, Lunasina, inhibidor de proteasas Bowman-Birk (BBI, por su siglas en inglés), lectinas, saponinas e isoflavonas en semillas de soya cultivar BRS133. Las semillas se limpiaron con



**Cuadro 4. Efecto de la germinación de leguminosas sobre contenido de fitoquímicos**

Material	Condiciones de germinación	Fitoquímicos
Soya <sup>1</sup>	<b>Desinfección:</b> Hipoclorito Na, enjuague con aguadestilada <b>Remojo:</b> no se reporta <b>Germinación:</b> 25°C/42 h, 30°C/63 h, 25°C/42 h <b>Secado:</b> Liofilización	Se optimizó bioproceso germinación aplicando Metodología de Superficie de Respuesta. La germinación de soya a 25°C/42 h incrementó Lunasina (+62%) y disminuyó Lectinas (-59%) y actividad de Lipoxigenasa (-70%). El mayor incremento (+153.9%) en la concentración de agliconas de isoflavonas se observó a 30°C/63 h. A 25°C/42 h se incrementó (+32%) contenido de saponinas.
Frijol <sup>2</sup> blanco, alverja, lenteja y garbanzo	<b>Desinfección:</b> Hipoclorito Na 0.07%/ 30 min <b>Remojo:</b> Agua destilada 5 h / Agitación cada 30 min. <b>Germinación:</b> 20°C/5 días <b>Secado:</b> 50°C / 5 h	Todas las leguminosas incrementaron contenido de compuestos fenólicos totales (mg/k) (Garbanzo: de 126 a 193, Frijol blanco: de 100 a 103, Lenteja de 96 a 105, Alverja: de 126 a 144); el mayor incremento correspondió a garbanzo.
Soya <sup>3</sup> /frijol mungo	<b>Remojo:</b> agua temp ambiente/10 h <b>Germinación:</b> 25°C/24, 48,72,96, 120 h	Se incrementó contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en ambos materiales: Soya: + 330% al 4to día germinación, Frijol mungo: + 103 % al 1er día de germinación. Incremento en contenido de isoflavonas agliconas (de 1.62 a 3.99 mg/g); el mayor incremento (+147%) se presentó al 3er día de germinación.
Frijol <sup>4</sup> mungo	<b>Desinfección:</b> Inmersión en etanol <b>Remojo:</b> agua desionizada 12 h <b>Germinación:</b> 22°C (12 luz /12 h oscuridad) 5 días <b>Secado:</b> Liofilizado	El contenido de CFT se incrementó (+841%). Los flavonoides aumentaron de 5 a 13.7 mg/ g.

<sup>1</sup> Paucar-Menacho y col (2010), <sup>2</sup> Gharachorloo y col. (2013), <sup>3</sup> Huang y col (2014),

<sup>4</sup> Pajak y col (2014)

hipoclorito de sodio (100 mg / kg) por 10 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se mantuvieron a temperatura del cuarto por ocho horas. La germinación se llevó a cabo en cámaras de germinación utilizando lotes de 500 g de semillas. Los efectos de las variaciones en tiempo y temperatura de germinación sobre compuestos bioactivos se evaluaron utilizando, como herramienta de optimización, la metodología de superficie de respuesta. Como variables de proceso se seleccionaron temperatura y tiempo de germinación [Temperatura de germinación (TG) = 18-32°C, tiempo de germinación (tG) =12-72 h]. Se utilizó un compuesto central rotatable que generó 22 tratamientos. Los germinados provenientes de cada tratamiento se congelaron (-30°C/4h), liofilizaron y, finalmente, se molturaron para producir harinas de soya germinada. La germinación de semillas de soya a 25°C causó un incremento de 62% en la concentración de Lunasina y decrementos de 59% y 70% en contenido de lectinas y actividad de lipoxigenasa, respectivamente. Un incremento óptimo en la concentración de isoflavonas agliconas se observó a 30°C/63 h. Además, se observó un incremento significativo (+32%) en la concentración de saponinas a 25°C/42 h.

Bains y col (2011) optimizaron el tiempo de germinación y los tratamientos térmicos posteriores con el propósito de incrementar la disponibilidad de hierro proveniente de germinados de leguminosas (frijol mungo, garbanzo, frijol caupí). Los granos se germinaron por tres periodos de tiempo seguidos por cocción de los germinados mediante dos métodos [cocción a presión (15 psi), cocción por microondas (800 W)]. Se remojaron 100 g de semillas crudas de frijol mungo, garbanzo y frijol caupí por 10, 12 y 8 h, en agua destilada, antes de ser sometidos a germinación (25°C/HR=70%) por tres periodos de tiempo (Frijol mungo: 12, 16, 20 h / Garbanzo: 36, 48, 60 h / Frijol caupí: 16, 20, 24 h). Lotes de 250 g de germinados de cada leguminosa se sujetaron a dos tratamientos hidrotérmicos: cocción a presión (15 psi) y cocción en microondas (800 W). Los tiempos de cocción para frijol mungo y frijol caupí fueron de 1 y 7 min para cocción a presión y cocción en microondas, respectivamente. Para garbanzo los tiempos de cocción

fueron de 5 y 15 min para los dos tratamientos mencionados. Las muestras procesadas (germinadas + cocción) se secaron en estufa con aire caliente a 60°C y posteriormente se molturaron para obtener harinas (pasaron a través de malla de 5 mm); se guardaron en bolsas de polietileno y se almacenaron (20°C / HR=60°C) para su análisis. El estudio concluyó que los periodos de germinación más largos (Frijol mungo: 20 h / Garbanzo: 60 h / Frijol caupí: 24 h) seguido por cocción a presión por tiempo optimizado (Frijol mungo: 1 min / Garbanzo: 5 min / Frijol caupí: 1 min) fueron los adecuados para obtener la mayor biodisponibilidad de hierro.

Chong (2012) estudió la actividad antioxidante y antiproliferativa de extractos metanólicos obtenidos de semillas de frijol mungo germinadas; los resultados indicaron que los extractos obtenidos de los germinados son más efectivos que los obtenidos de la semilla y podrían ser una fuente potencial de antioxidantes y por lo tanto ofrecer efectos benéficos a la salud.

Benítez y col (2013) reportaron que el bioproceso de germinación de algunas leguminosas no convencionales impactó en los contenidos de fibra dietaria insoluble (FDI) y soluble (FDS), promoviendo un mejoramiento de la relación FDI/FDS, lo cual influyó favorablemente en el mejoramiento de propiedades tecnológicas y terapéuticas.

Swieca y col (2013) reportaron que las condiciones de germinación tienen una influencia notable sobre el contenido de almidón y su biodisponibilidad. El germinado de lenteja puede ser considerado un alimento funcional debido a su índice glicémico bajo y al contenido alto de almidón resistente. La optimización del bioproceso de germinación permitiría el máximo beneficio nutricional / nutracéutico al utilizar esta tecnología de costo bajo.

Huang y col (2014) al estudiar el bioproceso de germinación de frijol mungo observaron un incremento (+103%) en el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en el primer día de germinación. Además, reportaron que al cuarto día de germinación de soya se evidenció un incremento (+330%) en CFT en relación al grano crudo. La germinación de soya también promovió un incremento

en el contenido de isoflavonas agliconas, de 1.62 a 3.99 mg/g; el contenido mayor se observó al tercer día de germinación, significando un incremento de +147% en relación a la soya sin germinar.

## **F EL GARBANZO EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA**

### **1 Generalidades**

El garbanzo pertenece a la familia *FABACEAE*, tribu *Vicieae*, subfamilia *Papilionoides*, género *Cicer*, el cual comprende 39 especies conocidas. *Cicer arietinum* L es la única especie de importancia económica y agronómica.. Existen dos tipos de garbanzo en base a su color y distribución geográfica: **(i) Desi** (microsperma).- Con origen en la India, cuyas flores presentan una coloración rosada, tallos con pigmentación antociánica y testa gruesa y pigmentada que pueden ser de color café, café luminoso, amarillo, naranja, negro o verde y **(2) Kabulli** (macrosperma).- Originario de la región del Mediterráneo y el Medio Oriente, de flores blancas, sin pigmentación en tallos y testa delgada de color blanco a crema (Crispín y López, 1976; Moreno y Cubero, 1978; Chavan y Kadam, 1989).

El garbanzo es uno de los cultivos de leguminosas más antiguos y de gran consumo en el mundo. Es un alimento básico en algunos países tropicales y subtropicales. Es una fuente económica de proteína de calidad alta en la dieta de millones de personas en países en vías de desarrollo. Además, los granos de garbanzo son una buena fuente de carbohidratos y minerales, por lo que es considerado como un alimento vegetariano saludable y uno de los alimentos más importantes para la dieta humana y de animales en el sur de Asia. Además de su uso culinario, el garbanzo ha sido aceptado como medicina tradicional natural en China desde hace más de 2,500 años. La semilla de garbanzo tiene un contenido bajo de sodio y lípidos, por lo que puede ser utilizada en dietas libres de gluten, para diabéticos, bajas en sal y calorías así como en dietas bajas en colesterol y altas en fibra dietaria (Khalil y col, 2007; Zhao y col, 2009).

El grano de garbanzo puede considerarse como un alimento con potencial funcional debido a que es una buena fuente de fitoquímicos, como polifenoles y flavonoides, que le confieren actividades biológicas importantes como la actividad antioxidante (Segev y col, 2010).

## **2 Composición química**

### **a Proteínas**

Las leguminosas poseen contenidos altos de nitrógeno, debido a su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico a través de una relación simbiótica con los microorganismos del suelo. La concentración de proteína de la semilla de garbanzo varía de 16.7% a 30.6% y de 12.6% a 29.0% para semillas tipo desi y kabuli, respectivamente, y es aproximadamente de 2-3 veces más alto que en cereales (Wood y Grusak, 2007) (**Cuadro 5**). La proteína es esencial en la dieta ya que provee de aminoácidos necesarios para la construcción de nuevas proteínas, para reparar y reemplazar tejidos así como, sintetizar enzimas, anticuerpos y hormonas. Por lo tanto, el garbanzo es un acompañante ideal de los cereales, los cuales presentan contenidos altos de aminoácidos azufrados (Met+Cys) pero son limitados en Lys. Las proteínas de reserva más importantes en garbanzo son Globulinas (57% de la proteína total), Glutelinas (18%), Albúminas (12%) y Prolaminas (2%) (Singh y col, 1982).

Una nueva medida para evaluar la calidad de las proteínas es mediante la determinación de DIAAS (score de aminoácidos indispensables digeribles, por sus siglas en inglés), el cual se define como  $\% \text{ DIAAS} = 100 \times [(\text{mg de aminoácido indispensable digerible en 1 g de proteína dietaria}) / (\text{mg del aminoácido indispensable dietario en 1 g de proteína dietaria de referencia})]$  (FAO/WHO, 2013). Diferentes productos alimenticios utilizan a la proteína de origen vegetal y animal como ingrediente en la formulación de alimentos, debido a su valor nutritivo, a su capacidad antioxidante y a diversas propiedades funcionales que le confieren al alimento como la emulsificación, formación de espuma y de gel, absorción de agua y aceite, viscosidad entre otras. Debido a ello se realizan

**Cuadro 5.** Composición química del grano de garbanzo

<b>Componente (% , bs)</b>	<b>Tipo de garbanzo</b>	
	<b>Desi</b>	<b>Kabuli</b>
Proteína	16.7-30	12.6-29
Lípidos	2.9-7.4	3.4-8.8
Ácidos grasos saturados	12-14	12-14
Ácidos grasos poliinsaturados	62-67	62-67
Carbohidratos	51-65	54-71
Almidón	30-57	30-57
Azúcares solubles	5.3-11.8	5.5-7.5
Fibra cruda	4-13	1-5
Fibra dietaria	19-23	11-16
Minerales	2.04-4.2	2-3.9
<b>Vitaminas (mg/100 g)</b>		
Tiamina	0.48	0.59
Niacina	1.54	1.76
Vitamina E (Tocoferol/Tocotrienol)	0.82	0.82-13.7
<b>Minerales (mg/100 g)</b>		
Calcio	103-259	103-259
Magnesio	119-167	119-167
Hierro	3.0-9.8	3.0-9.8

**Wood y Grusak (2007)**

diversas investigaciones para encontrar nuevas alternativas proteínicas por lo que la proteína de garbanzo ha sido ampliamente estudiada, ya que además de su excelente contenido de proteína, presenta buenas características funcionales, por lo que los resultados muestran claramente el potencial del garbanzo como alternativa proteínica funcional (Aydemir y col, 2013). La calidad de la proteína es afectada por la composición de aminoácidos, disponibilidad biológica, digestibilidad e interferencia de factores antinutricionales en su utilización. Las evaluaciones biológicas de la proteína son esenciales debido a que el análisis químico no revela por sí mismo, el grado de biodisponibilidad de la proteína.

Los métodos que se utilizan para la evaluación biológica de la proteína son: **(i) De desarrollo:** PER (Relación de eficiencia proteínica), PDCAAS (Digestibilidad proteínica corregida por perfil de aminoácidos esenciales), NPR (Retención neta de proteína), RPV (Valor relativo de la proteína), y **(ii) De balance de nitrógeno:** BV (Valor biológico), NPU (Utilización neta de proteína), TD (Digestibilidad verdadera).

## **b Lípidos**

El garbanzo exhibe contenidos altos de lípidos, más que otros cultivos de leguminosas. El contenido de lípidos varía de 2.9 a 7.4 % para granos tipo desi y de 3.4 a 8.8% para kabuli. Los ácidos grasos insaturados constituyen el 67% de los lípidos totales, siendo los dos ácidos grasos más importantes el Omega-6 (Linoléico) y Omega-3 (Linolénico), los cuales son necesarios para el buen funcionamiento fisiológico y el mantenimiento celular. El ácido Linoléico es ácido graso esencial para los seres humanos. Los granos tipo desi contienen de 46-62% de ácido Linoléico mientras que en kabuli se presentan rangos de 16-56%. El contenido de ácido Oleico varía de 18-23% y de 19-32% para desi y kabuli, respectivamente (Wood y Grusak, 2007). El ácido Linoléico posee actividad hipocolesterolemica y puede reducir la probabilidad de aterosclerosis y enfermedades coronarias. Un contenido alto de ácido Linoléico en garbanzo podría explicar los niveles bajos de colesterol sérico en dietas que incluyen garbanzo (Pittaway y col, 2006).

Dentro de los ácidos grasos saturados el más importante es el Palmítico; representa 9% de los lípidos totales (Campos-Vega y col, 2010). El contenido de aceite del garbanzo incluye Tocoferoles, Tocotrienoles y Esteroles (Akihisa y col, 1992; 2000). Las propiedades antioxidantes de los Tocotrienoles han sido reportadas como mayores que las de los Tocoferoles, además de otras propiedades biológicas importantes como la inhibición de la síntesis del colesterol (Yamaoka y col, 1991).

### **c Carbohidratos**

Son el principal componente nutricional del garbanzo, con un 51-65 % en granos tipo desi y de 54-71% en kabuli. Los almidones constituyen su principal componente, su contenido varía de 37-51% (bs). También posee una cantidad sustancial de fibra dietaria (20-23%), compuesta principalmente de celulosa y hemicelulosa. La concentración de fibra está directamente relacionada al porcentaje de testa, el cual varía según la variedad. Otros carbohidratos presentes son los oligosacáridos de la familia de la Rafinosa (Rafinosa, Estaquiosa, Verbascosa); el grano de garbanzo contiene de 0.4- 2.8% y de 1.2- 3.9% de oligosacáridos en desi y kabuli respectivamente (Williams y Singh, 1987; Wood y Grusak, 2007).

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa no pueden ser hidrolizados ni absorbidos en el tracto digestivo y pasan al intestino grueso donde son fermentados por las bacterias colónicas liberando gas y causando flatulencias. Además de los oligosacáridos, otros compuestos que también resisten a la digestión en el intestino delgado y que disminuyen la respuesta glucémica son los polisacáridos que conforman la pared celular y el almidón resistente (Hedley y col, 2001; Tirapegui y Macedo, 2006).

### **d Vitaminas y minerales**

El grano de garbanzo contiene vitaminas hidrosolubles del complejo B (Tiamina, Niacina, Piridoxina, ácido Fólico). El ácido Fólico se requiere para la



síntesis de RNA y replicación del ADN, así como para el crecimiento y mantenimiento de nuevas células. El garbanzo contiene de 150-557  $\mu\text{g/g}$  de folatos; el ácido Fólico podría ayudar en la prevención de algunos tipos de cáncer inducidos por daños al ADN (Christensen, 1996; Giovannucci y col 1998; Coppen y Bolander, 2005). El grano de garbanzo contiene 4 mg de vitamina C /100 g, aunque es fácilmente destruida en el procesamiento o por tiempos largos de almacenamiento. En el garbanzo la vitamina A se encuentra como provitamina A, en forma de carotenoides, los cuales son los responsables del color amarillo de los cotiledones. El garbanzo contiene aproximadamente 49  $\mu\text{g}$  de  $\beta$  caroteno /100g entre testa y cotiledón (Atienza y col, 1998). Además, el garbanzo contiene otros carotenoides como Luteína y Zeaxantina que están asociadas con la prevención de enfermedades coronarias, aterosclerosis y degeneración macular relacionada con la edad (IMFNB, 2001). La vitamina E (Tocoferoles y Tocotrienoles) se encuentran en una concentración de 13.7 mg de vitamina E/ 100g, la característica más importante es su capacidad antioxidante más aún que las vitaminas A y C; se ha reportado que limita la oxidación de la lipoproteína de densidad baja (LDL) y previene la formación de coágulos en la sangre y el bloqueo de carcinógenos de estómago (Saldeen y Saldeen, 2005). La vitamina K es requerida para modificar ciertas proteínas, en la coagulación de la sangre en la formación de huesos y salud vascular, el garbanzo contiene concentración baja de vitamina K comparado con vegetales de hojas pero más que algunas frutas y productos animales (USDA/ARS, 2005).

La semilla de garbanzo al igual que otros pulsos, no solo aporta variedad a la dieta diaria basada en cereales de millones de personas en Asia y África, si no que también es una buena fuente de minerales. La semilla de garbanzo cruda (100 g) proporcionan en promedio unos 5 mg de Hierro, 4.1 mg de zinc, 138 mg de magnesio y 160 mg de calcio por 100 g de semillas de garbanzo. No hay diferencias significativas en el contenido de minerales entre genotipos desi y kabuli a excepción del calcio, que se presenta en mayor cantidad en las semillas de garbano desi (154 vs 210 mg/100 g). Minerales como el Fe se encuentra en

menores cantidades con respecto a otros pulsos como lentejas y frijoles (8.6 y 7.4 ,g/100 g) respectivamente, sin embargo es también fuente de selenio, un importante oligoelemento en una concentración de 8.2 µg/100 g (Jukantil y col, 2012). Minerales como zinc, cobre y selenio también llamados micronutrientes desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento y refuerzo de los sistemas inmune y antioxidante. Así como también afectan la compleja red de genes (nutrigenómica) con actividades pro y anti-inflamatoria (Mocchegiani y col. 2014). La deficiencia de minerales deriva en enfermedades cardiovasculares y un desbalance en la mayoría de las rutas biológicas (Singh, 2017).

Por otra parte, la biodisponibilidad de minerales, particularmente el hierro se ve mejorada, durante el bioproceso de germinación, específicamente cuando se incrementan los tiempos de germinación, debido a la reducción de fitatos y al incremento en el contenido de ácido ascórbico (Bains y col, 2011).

### **3 Valor nutricional**

La calidad nutricional de la semilla de garbanzo varía dependiendo del ambiente, clima, nutrición del suelo, prácticas agronómicas y estrés debido a factores bióticos y abióticos (Singh y col, 1982; Chavan y col, 1989; Wood y Grusak, 2007). La composición de aminoácidos del garbanzo es bien balanceada, presenta altos niveles de Lys y los aminoácidos limitantes son los azufrados (Met+Cys) (Wood y Grusak, 2007) (**Cuadro 6**). En general el cotiledón es la parte que aporta más beneficios nutricionales mientras que la testa contiene ciertos factores antinutricionales. Los granos tipo desi tienen una testa más gruesa que los tipo kabuli, reflejando mayores contenidos de fibra en las semillas tipo desi. El garbanzo, como otras leguminosas, es una buena fuente de energía, proteína, minerales (Ca, P, Fe, K, Mg), vitaminas (Tiamina, Niacina, ácido Ascórbico), fibra, ácidos grasos (Linoléico, Linolénico) y también contiene fitoquímicos con potencial benéfico para la salud (Wood y Grusak, 2007).

**Cuadro 6.** Composición de aminoácidos esenciales de cultivares de garbanzo

<b>Aminoácido ( g/100 g proteína)</b>	<b>Desi</b>	<b>Kabuli</b>
<b><i>Aminoácidos esenciales</i></b>		
Arginina	8.5	8.0
Histidina	3.2	3.0
Isoleucina	4.8	5.2
Leucina	8.5	9.5
Lisina	7.0	7.8
Metionina	1.1	1.3
Fenilalanina	5.3	6.2
Treonina	3.0	3.5
Triptófano	0.9	1.1
Valina	4.4	5.2
Total	46.1	50.6

Iqbal y col (2006)

## 4 Fitoquímicos

Los granos de garbanzo contienen sustancias químicas (microcomponentes) que causan algunas dificultades digestivas cuando son consumidas por personas o animales (Nadal y col, 2004). En sus semillas se pueden encontrar compuestos bioactivos incluyendo compuestos fenólicos, ácido Fítico, inhibidores de proteasas (Tripsina y Quimiotripsina), inhibidores de amilasas ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa) y oligosacáridos. **Ver Cuadro 7.**

### a Compuestos fenólicos

Actualmente, los compuestos fenólicos están siendo estudiados por su potencial nutracéutico; desde el punto de vista químico tienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos que le proporcionan poder antioxidante, debido, a la tendencia de estos grupos a quelar metales. El consumo regular de antioxidantes fenólicos está ligado a beneficios de salud, principalmente los relacionados con sus efectos anticancerígenos (Roleira y col, 2015). Los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante varían entre las diferentes variedades de pulsos, los pulsos con pigmentación oscura presentan más compuestos fenólicos comparados con las variedades ligeramente pigmentadas. La presencia de fenólicos y flavonoides especialmente en la testa, también varía de acuerdo a la pigmentación del grano, estos compuestos imparten diferentes propiedades a la semilla, entre estas propiedades podemos mencionar la actividad antitumoral, antiinflamatoria y antialérgica (Singh, 2017). Por otra parte, la estructura química ideal que poseen los compuestos fenólicos facilita la donación de hidrógenos o electrones de los grupos hidroxilos posicionados a lo largo del anillo aromático que hacen posible el barrido de los radicales libres (Dey y col, 2016).

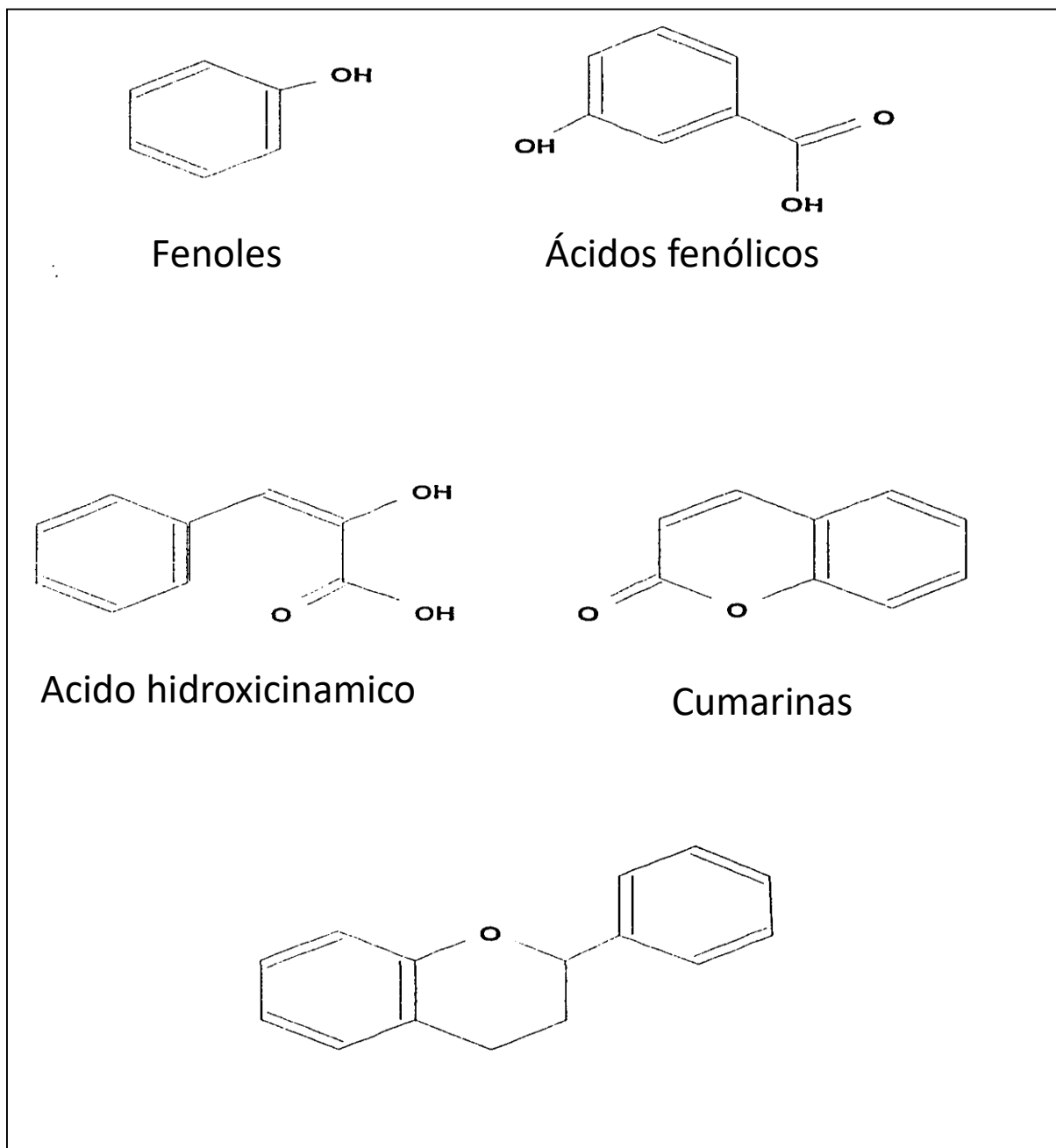
Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura en 15 clases principales entre las que sobresalen ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, taninos y flavonoides (Liu, 2004) (**Fig 8**). Estos compuestos existen principalmente como glicósidos ligados a restos de azúcares, ácidos orgánicos,

**Cuadro 7.** Fitoquímicos en grano de garbanzo

<b>Propiedad</b>	<b>Desi</b>	<b>Kabuli</b>
<b><i>Compuestos fenólicos<sup>1</sup></i></b>		
Libres	209	14
Ligados	797	43
Totales	1006	57
<b><i>Flavonoides<sup>2</sup></i></b>		
Libres	206	15
Ligados	863	189
Totales	1069	204
<b><i>Isoflavonas<sup>3</sup></i></b>		
Biocanina A	838	1,420-3,080
Formononetina	215	94-126
<b><i>Oligosácaridos<sup>4</sup></i></b>		
Estaquiosa	6.5	6.5
Rafinosa	2.2	2.2
Verbascosa	0.4	0.4
<b><i>Taninos<sup>4</sup></i></b>	0.72	0.51
<b><i>Ácido fítico<sup>4</sup></i></b>	2.28	2.8 <sup>a</sup>
<b><i>Polifenoles<sup>1</sup></i></b>	6.0	2.2
<b><i>Saponinas</i></b>	56	21.9
<b><i>Inhibidores de proteasa<sup>5</sup></i></b>		
Tripsina	15.7	12.1
Quimotripsina	13.19	10.74
<b><i>Inhibidores de amilasa<sup>5</sup></i></b>	0.0-15.0	7.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>µgEAG/g muestra; <sup>2</sup> µ EC/g muestra; <sup>3</sup> µg/100 g; <sup>4</sup> %; <sup>5</sup> mg/100 g muestra

Wood y Grusak (2007); Garzón-Tiznado y col, 2012



**Fig 8.** Estructura común de los compuestos fenólicos

Liu (2007)

aminas, lípidos, carbohidratos y a otros fenoles. Los compuestos fenólicos más comúnmente encontrados en granos enteros son ácidos fenólicos y flavonoides. La síntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar en el retículo endoplásmico intervienen muchos tipos de enzimas que permiten diferentes clases de compuestos fenólicos previamente descritos. La fenilalanina es un aminoácido esencial sintetizado a través de la ruta del ácido shikímico y es un precursor de la síntesis de los fenilpropanoides (Shahidi y Yeo, 2016).

Sin embargo, algunos de los compuestos fenólicos considerados como principios activos de plantas medicinales, se originan a través de rutas mixtas, que combinan las vías del ácido Shikímico y de los poliacetatos, tal es el caso de los flavonoides.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en diversos tipos de plantas comestibles, especialmente en frutas y vegetales, leguminosas, así como en té y vino. Los polifenoles se han convertido en un objetivo importante de investigación debido a sus efectos benéficos en la salud, especialmente en el tratamiento y prevención de cáncer (Chen y col, 2011; Weng y col, 2012) y enfermedades cardiovasculares (Kuriyama y col, 2006; Mursu y col, 2008). Se les atribuyen, además, otros efectos como los antiaterogénicos (Liu y col, 2004 a), antiúlcera (Zakaria, 2011), antitrombótico (Han y col, 2012; Tao y col, 2012), antiinflamatorio (Beara y col, 2012; Zimmer y col, 2012), anticoagulante (Bijak y col, 2011), inmunomodulación (Schutz y col, 2010), antimicrobial (Xia y col, 2011) y vasodilatador (Mudnic y col, 2010).

Segev y col (2010) realizaron investigación sobre semillas de garbanzo tipo desi, pigmentados, y encontraron que estos poseen concentraciones altas de compuestos fenólicos totales (150-680 mg equivalente de Catequina /100 g de muestra), y de flavonoides totales (380-1,800 mg equivalente de Catequina /100 g de muestra).

Se han identificado más de 5,000 flavonoides entre las que destacan las isoflavonas. Las isoflavonas son una subclase de flavonoides también llamados fitoestrógenos, por su actividad estrogénica. Los fitoestrógenos son un grupo de

polifenoles no esteroideos que inducen una respuesta biológica y pueden imitar o modular la acción de estrógeno endógeno, regularmente por uniones a receptores de estrógenos (Ross y Kasum, 2002; Rostagno y col, 2009; Ward y Kuhnle, 2010). La clase principal de fitoestrógenos son las isoflavonas, las cuales se encuentran principalmente en leguminosas, como el garbanzo y la soya entre otras leguminosas y los lignanos que se encuentran en cereales y semillas de lino, así como en frutas y vegetales (Kuhnle y col, 2009).

Las isoflavonas se encuentran en su forma natural en forma de glicósido y se conjugan en la posición 7 y son regularmente esterificadas con grupos acetyl o malonil en la posición 6' del azúcar residual. En plantas, las isoflavonas más ampliamente estudiadas Genisteína y Daidzeína se encuentran generalmente conjugadas (Acetilos, glicósidos, malonilos) y son hidrolizadas en el intestino humano a aglicona (la cual es su forma biológicamente activa). En las semillas de las leguminosas es donde se encuentran concentraciones significativas de isoflavonas, como por ejemplo en soya y garbanzo (Boniglia y col, 2009; Alves y col, 2010, Wu y col, 2012).

Las isoflavonas han atraído la atención de los investigadores principalmente por su posible función en aminorar los síntomas de la menopausia y osteoporosis; también se han reportado efectos potenciales en enfermedades cardiovasculares, función cognositiva y cáncer de mama y próstata. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los flavonoides presentan diversos efectos benéficos, los cuales juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud. Muchas de las propiedades benéficas de estos compuestos, incluyendo la prevención del cáncer, se deben a la aglicona (Puupponen y col, 2001; Lee y col, 2005; Meskin y col, 2005; Espín y col, 2007; Verheus y col, 2007).

El garbanzo es una de las fuentes más ricas en isoflavonas solo después de la soya; las formas activas más comunes de isoflavonas son Daidzeína, Genisteína, Formononetina y Biocanina A. Mazur y col (1998) encontraron que la principal isoflavona en semillas de garbanzo era Biocanina A, con valores de 838 y 1,420-3,080 µg/100g para garbanzo tipo desi y kabuli, respectivamente; la siguiente



isoflavona más abundante es la Formononetina con contenidos de 215 y 94-126 µg/100g para granos de garbanzo desi y kabulli, respectivamente.

Giron y col (2004) reportaron que un extracto de garbanzo, el cual contenía isoflavonas, inhibía el crecimiento de tumores epiteliales.

Zhao y col (2009) reportaron que los principales compuestos bioactivos de la semilla de garbanzo son las isoflavonas, las cuales son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas con actividades como la defensa de la misma hacia el ataque microbiano y condiciones ambientales, se conocen más de 1,600 isoflavonoides, los cuales son en su mayoría aislados de leguminosas.

Konar y col (2012) cuantificaron isoflavonas libres y conjugadas en leguminosas y concluyeron que el garbanzo es una buena fuente de isoflavonas, principalmente de Biocanina A, siendo este una alternativa de la soya. Ver **Cuadro 8**.

## **b Saponinas**

Las saponinas, son una clase de compuestos naturales presentes en los pulsos, varían en su estructura y composición, se dividen en dos grupos principales glicosidos triterpenoides y esteroides. Kerem y Shashoua (2005) reportaron la presencia de saponinas en garbanzo, con un contenido de 25-56 mg/g, nivel mayor que el reportado para soya. En semillas de garbanzo se han identificado mediante cromatografía líquida UPLC-PDA-ESI/MS, dos tipos de saponinas, soya saponina Bb y soyasaponina βg (Ha y col, 2014). Han sido ampliamente utilizadas como drogas por sus propiedades farmacéuticas principalmente por su actividad anticancerígena.

Chen en 2003, estudió el efecto de las saponinas en células de cáncer de mama MDAMB231 y MCF7, mostrando el efecto inhibitorio de las saponinas en la proliferación de estas líneas celulares, mediante una actividad dependiente de la dosis, los mecanismos por los cuales se limitó la proliferación de células de cáncer de mama fueron el arresto del ciclo celular y la activación de rutas apoptóticas.

**Cuadro 8.** Contenido de isoflavonas en garbanzo

<b>Material</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Garbanzo <sup>1</sup>	Determinar contenido de isoflavonas libres (Biocanina A, Gliciteina, Genisteina, Formononetina, Daidzeína) y conjugadas (Ononina, Genisteina, Daidzina, Glicitina, Sissotrina)	El garbanzo presentó mayores cantidades de isoflavonas, libres, conjugadas y totales, seguido de frijol y lenteja.	El garbanzo es una fuente significativa de isoflavonas en términos de composición y contenido de Biocanina A; puede servir como alternativa a la soya
Garbanzo <sup>2</sup>	Evaluar contenido de compuestos bioactivos y su potencial impacto en la salud humana	Los principales isoflavonas de garbanzo son Daidzeina, Genisteina, Formononetina y Biocanina A (0.04, 0.06, 0.14, 1.7 mg/100g respectivamente)	Actividades biológicas asociadas a isoflavonas: Reducción de la incidencia de osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, prevención de cáncer y para el tratamiento de síntomas de climaterio

<sup>1</sup>Konar y col ( 2012), <sup>2</sup>Campos Vega y col (2010)

Por otra parte, la presencia de saponinas y compuestos fenólicos en extracto de garbanzo fermentado, podrían estar relacionadas con el incremento en la actividad antioxidante del extracto, medida por el método ABTS (Xiao y col, 2014).

### **c Oligosacáridos**

Los oligosacáridos comprenden un diverso grupo de carbohidratos solubles de bajo peso molecular, ampliamente reconocidos como componentes de la fibra dietaria y como ingredientes funcionales.

Los oligosacáridos pertenecen a la familia de la Rafinosa (Verbacosa, Estaquiosa, Rafinosa) son encontrados en concentraciones apreciables en leguminosas y son reconocidos como prebióticos potenciales (Tosh y Yada, 2010). La Rafinosa es un trisacárido y está compuesta por una molécula de Galactosa y una de Sacarosa unidas mediante un enlace glicosídico ( $\alpha$  1-6); la Estaquiosa (tetrasacárido) y la Verbacosa (pentasacárido) son sintetizados a partir de Rafinosa, además de una variedad de unidades de  $\alpha$ - Galactosil (Roberfroid y Slavin, 2000). En la actualidad, algunas investigaciones de interés se desarrollan en el estudio del potencial benéfico asociados a estos oligosacáridos. La Rafinosa y la Estaquiosa, han sido investigados por varios grupos de investigación en Japón, por su efecto sobre la microflora intestinal humana. Un oligosacárido prebiótico es un carbohidrato que permite cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora intestinal responsable del bienestar y de la salud de su hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995; Cummings y Stephen, 2007).

El beneficio de los prebióticos hacia el hospedero es la promoción del crecimiento de un selecto grupo de microorganismos probióticos y la activación del metabolismo bacterial en el tracto intestinal una vez que ellos son fermentados por las bacterias benéficas del colon. La fermentación de los prebióticos en el colon da lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Butírico, Acético, Láctico, Propiónico) los cuales están relacionados con distintas actividades entre las que destacan la prevención del cáncer de colon y la regulación del metabolismo de los lípidos, entre otras (Emenaker y col, 2001;

Marcil y col, 2002; Isolauri y col, 2004; Nicholson y col, 2005; Charalampopoulos y Rastall, 2011; Forssten y col, 2011).

Las bacterias probióticas tienen múltiples y diversas funciones, como suprimir el número de células viables, debido a la producción de compuestos con actividad antimicrobiana. También alteran el metabolismo microbiano incrementando o disminuyendo la actividad enzimática y estimulan la inmunidad aumentando los niveles de anticuerpos y la actividad de macrófagos. La actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos ocurre reduciendo el pH en el lumen debido a la producción de ácidos Láctico y Acético, y otros compuestos antimicrobianos, bloqueando la adhesión bacteriana al epitelio de las células y disminuyendo la población patógena). Así los probióticos actúan en la microbiota intestinal y colonizan las mucosas, esta acción impide la adhesión y la consecuente producción de toxinas o la invasión de bacterias patógenas en el epitelio (Fuller 1989; Walker, 2008; Ng y col, 2009; Saad y col, 2011; Zhang y col 2011 b).

Estos microorganismos promueven el incremento de la biodisponibilidad de ciertos nutrientes como ácidos grasos de cadena corta, proteínas, minerales como Calcio el cual participa en el metabolismo de huesos. Cepas como *Lactobacillus acidophilus*, *L casei*, *L platarum*, *L rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* son los más utilizados en la formulación de nuevos productos probióticos vegetales (Furtado y col, 2013).

#### **d Ácidos grasos**

Los beneficios de los ácidos grasos Omega 3 (EPA= ácido eicosapentaenoico; DHA= ácido docosahexaenoico) han sido ampliamente estudiados para una gran variedad de condiciones médicas incluyendo la prevención del cáncer (Gillies, 2007). La habilidad de los ácidos grasos Omega 3 para reducir Citocinas ha generado mucho interés, esto debido a la posibilidad de modular la fase aguda de las reacciones inflamatorias. Suplementos de ácidos grasos Omega 3 han mostrado disminución en la producción de interleucinas con acción proinflamatoria (IL1, IL6 y TNF: factor de necrosis tumoral) (Meydani y Dinarello, 1993). Entre los

ácidos grasos polinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), el ácido Linoléico y sus derivados han mostrado potencial quimiopreventivo en cáncer de colon, próstata y seno (Berquin y col, 2008). Los ácidos grasos omega 3 han sido correlacionados con efectos benéficos a la salud, incluyendo efecto cardioprotector, antiarrítmico, antitrombótico, antiinflamatorio, antihipertensivo y antihiperlipidemia (Buhr y Bales, 2010).

## **5 Propiedades nutracéuticas en garbanzo**

Los microcomponentes que confieren propiedades nutracéuticas a las leguminosas han empezado a comercializarse como alimentos funcionales e ingredientes nutracéuticos; investigaciones recientes muestran que el garbanzo ha sido aceptado desde hace más de 2,500 años como una medicina natural tradicional en algunas regiones de China (Zhao y col, 2009; Campos-Vega y col, 2010).

Pittaway y col (2006) observaron que con la inclusión de garbanzo en dietas de cinco semanas, en hombres y mujeres adultos, se logró una significativa reducción, en suero, de los niveles de colesterol total y en lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como otros beneficios fisiológicos asociados a un incremento en la saciedad de los pacientes.

Silva-Cristóbal (2007) realizó estudios sobre la digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de leguminosas de mayor consumo en México; encontró que la harina de garbanzo cocido contenía alrededor de 7.8% de almidón resistente, el cual según el “Proyecto de Investigación Europeo sobre Almidón Resistente” (EURESTA, por sus siglas en inglés) es la fracción del almidón que escapa a la acción de las enzimas, sigue su tránsito hacia el intestino grueso y llega al colon donde la flora intestinal lo fermenta, produciendo ácidos grasos de cadena corta (Propiónico, Butírico) que se asocian con la una incidencia baja de cáncer de colon.

Xu y Chang (2007) estudiaron la actividad antioxidante de nueve leguminosas, entre ellas garbanzo; éste exhibió una actividad inhibitoria de la oxidación de

lipoproteínas de baja densidad (LDL) de 2,190  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100 g muestra.

Segev y col (2010) realizaron investigación sobre semillas de garbanzo pigmentado, tipo desi, y encontraron que éstos poseen actividades antioxidantes de 730-3,110  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox /100g de muestra. Estos investigadores concluyeron que el garbanzo debido a su alta capacidad antioxidante, podría contribuir significativamente en el manejo y/o prevención de enfermedades asociadas al daño por radicales libres.

Kahlon y col (2012) reportaron que una dieta a base de garbanzo disminuye los niveles de colesterol en hámster. Después de dos semanas de alimentar a los hámster, el último día del periodo de alimentación todos los animales se sometieron a ayuno de 16 h y se aplicó anestesia para la colección del tejido muestra de hígado. Se reportó un aumento en el peso de los hámster de 32.6 g aproximadamente. Los hámster alimentados con garbanzo disminuyeron significativamente el nivel de colesterol total y el nivel de lipoproteínas de baja densidad en plasma, comparado con la dieta control que contenía caseína (17 % aproximadamente). Los datos sugieren que bajo las condiciones de este ensayo, una dieta a base de garbanzo mostró resultados prometedores en la reducción del riesgo de aterosclerosis y mejorar la salud humana.

Xue y col (2015) estudiaron el potencial antiproliferativo de péptidos de garbanzo a diferentes concentraciones en células de cáncer de mama (MCF7 y MDAMB231) concluyendo que los péptidos inhiben eficientemente la proliferación en ambas líneas celulares de manera dependiente de la dosis, con una  $EC_{50}$  de 2.3 y 1.5  $\mu\text{mol/ml}$ .

## **G GERMINACIÓN DE GARBANZO**

La germinación es una tecnología de procesamiento muy popular alrededor del mundo. Durante la germinación ocurren cambios importantes, por ejemplo algunos componentes de la semilla son degradados y usados para la respiración y síntesis de nuevos constituyentes celulares para el desarrollo de la planta, esto causa

cambios significativos en sus características bioquímicas. Diversos investigadores han estudiado el efecto de la germinación de garbanzo sobre composición química, valor nutricional, niveles y perfiles de fitoquímicos y actividad antioxidante.

Fernández-Orozco y col (2009) reportaron que los germinados de garbanzo son nutricionalmente superiores a la semilla sin germinar, poseen mayor capacidad antioxidante y niveles mayores de nutrimentos, mayor disponibilidad de éstos y propiedades sensoriales excepcionales. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de las condiciones de germinación sobre compuestos bioactivos y propiedades nutraceuticas relacionadas (inhibición de la proliferación de células de cáncer, genes anti y proapoptóticos, anticarcinogénico).

## **1 Condiciones para la germinación**

Khattak y col (2008) reportaron el efecto de las condiciones de germinación de garbanzo, principalmente tiempo de germinación y tipo de luz, sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno (contenidos altos de  $\beta$ -caroteno, bajo luz amarilla / 72 h), solubilidad proteínica (solubilidad alta en irradiados con luz verde / 120 h de germinación) y digestibilidad proteínica *in vitro* (digestibilidad alta después de 96 h).

Zhang y col (2011a) estudiaron el efecto de la adición de Se ( $\text{NaSeO}_3$ =Selenito de Sodio) durante la germinación de garbanzo sobre la concentración de dos isoflavonas: Biocanina A y Formononetina; el  $\text{NaSeO}_3$  se agregó a la solución de germinación, en una concentración de 50 mg  $\text{NaSeO}_3$ /L. Se obtuvieron germinados de garbanzo con contenido alto de Se [2.14  $\mu\text{g}$  Se/g germinado, (bs)] y un contenido moderadamente alto de isoflavonas [Biocanina A = 601.56  $\mu\text{g}$  / g germinado, (bs); Formononetina = 578.11  $\mu\text{g}$ /g germinado, (bs)]. El garbanzo germinado enriquecido con Se puede servir como una fuente conveniente de Se y de isoflavonas (Biocanina A / Formononetina).

Guardado Felix y col (2017) mostraron el efecto de diferentes concentraciones de selenito de sodio en la germinación de semillas de garbanzo tipo kabuli, bajo condiciones de germinación de 4 días/24°C, obteniendo importantes incrementos en el contenido de isoflavonoides, actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) y actividad antioxidante de 83%, 56% y 33% respectivamente, comparados con los germinados de garbanzo sin tratar con selenito de sodio. Sugiriendo que el enriquecimiento con selenio antes de germinar las semillas podría representar una buena fuente de selenio así como de isoflavonas.

## **2 Efecto de la germinación de garbanzo sobre composición química y valor nutricional**

### **a Composición química**

El-Adawy (2002) reportó que la germinación de granos de garbanzo (condiciones de remojo en agua destilada proporción 1:10 w/v por 12 h, a una temperatura de germinación 25°C, tiempo de germinación 3 días) incrementa el contenido de proteína cruda (+8.17%), nitrógeno no proteínico (+54.94%) y fibra cruda (+36.64%) con respecto a grano crudo. Este incremento es debido principalmente al uso de los componentes del grano y degradación de proteínas a péptidos simples durante la germinación. Asimismo, reporta que la germinación disminuye el contenido de lípidos (-4%) y carbohidratos totales (-4.01%) debido a que durante la germinación ambos componentes son utilizados como fuente de energía. También observaron reducciones en fracciones de carbohidratos: azúcares reductores (-25.72%), sacarosa (-28.57%) y almidón (-6.88%).

Khalil y col (2007) germinaron granos de garbanzo a temperatura ambiente (25°C) durante tiempos de 24, 72 y 96 h para estudiar el efecto de germinación sobre composición química del grano. Antes de la germinación los granos se remojaron a 25°C durante 8 h. Ellos reportaron un incremento (+22-24%) en el contenido de proteínas, a tiempo de germinación de 96 h. El contenido de carbohidratos se redujo (no se reportan datos específicos) en ambos genotipos de garbanzo; los contenidos de fibra y minerales no registraron cambios significativos.



Kaushik y col (2012) reportaron las ventajas de germinar semillas de garbanzo por 24, 48 y 72 h a una temperatura de 25°C. El proceso de germinación de incrementó el contenido de minerales como Fe y Zn al inicio del proceso y observaron pérdidas mínimas de K, Ca, Mg y P. En cuanto al contenido de vitaminas, se incrementó el contenido de riboflavina, niacina y ácido ascórbico debido principalmente a la reactivación del proceso de biosíntesis. El contenido de proteína incrementó con respecto al tiempo de germinación hasta alcanzar un aumento de 13% comparado con la semilla cruda, y en cuanto al contenido de carbohidratos, aunque se incrementó la concentración de azúcares reductores, se observó una disminución en el contenido de almidón.

En el **Cuadro 9** se muestra el efecto de la germinación de granos de garbanzo sobre su composición química.

#### **b Valor nutricional**

Fernández (1998) estudió el efecto de la germinación sobre la concentración de aminoácidos esenciales (AAE) en grano de garbanzo. Como condiciones de germinación utilizó 23°C/24,48,72 h, los granos se remojaron (25°C/ 12 h) antes de la germinación. Se reportó un incremento (+5.5%, 5.7%, 8%, 4.5%, 8% en la concentración de Thr, Lys, Val, Leu, Ile respectivamente, a un tiempo de germinación (de 24 h); después de 48 h se observaron decrementos en niveles de AAE. A excepción de lisina que presentó un aumento de 28.5% después de las 48 h de germinación. La relación de eficiencia proteínica (PER, por sus siglas en inglés) registró un incremento (+ 8.8%) por efecto de la germinación del grano.

Uppal y Bains (2012) reportaron el efecto de la germinación (remojo: 12 h), temperatura y tiempo de germinación (25°C/36,48,60 h) y tratamientos hidrotérmicos sobre la digestibilidad *in vitro* de proteína y de almidón en algunas leguminosas (garbanzo, frijol caupí, frijol mungo). Ellos observaron incrementos en contenido de proteínas y digestibilidad proteínica y de almidón *in vitro* después del remojo y la germinación de garbanzo.

**Cuadro 9.** Efecto de la germinación de garbanzo sobre composición química

Componente	Condiciones de germinación	Desi	Kabulli
Proteína <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/8 h <b>Germinación:</b> 25°C/24, 72, 96 h	Incremento (22.2-24.1%) a 96 h	Se presentó el mismo patrón: incremento (23.4-23.9 %) a 96 h
Lípidos <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/8 h <b>Germinación:</b> 25°C/24, 72, 96 h	Incremento en contenido de lípidos (5% en semilla sin germinar a 7.7% después de 96 h de germinación).	Se reporta un incremento en contenido de grasa de 5% en semilla sin germinar a 7.7% después de 96 h de germinación. El incremento de lípidos después del proceso de germinación fue mas pronunciado en garbanzo tipo kabuli
Carbohid <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/8 h <b>Germinación:</b> 25°C/24, 72, 96 h	Disminución en ambos genotipos de garbanzo (desi, kabuli). La disminución fue más pronunciada en tipo kabuli	.
Fibra <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/8 h <b>Germinación:</b> 25°C/24, 72, 96 h	No se detectaron cambios	No se detectaron cambios
Vitaminas <sup>2</sup>	<b>Desinfección:</b> Hipoclorito Na 0.07% 3 min <b>Remojo:</b> Agua destilada 5:30 h <b>Germinación:</b> 20°C/2,3 d en oscuridad		<b>Vit C:</b> No se detectó en grano crudo. Incrementó con tiempo de germinación : 2do día: 3.7 mg/100g, 3er día: 11.7 mg/100 mg <b>αTocoferol:</b> incrementó al 2do (+33%) y 3er (+44%) días de germinación. <b>Vit E:</b> Incrementó 7%
Vitaminas <sup>3</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/ 24 h <b>Germinación</b> :28°C/24, 48, 72, 96 h <b>Iluminación:</b>	La germinación + iluminación (luz verde) incrementó (+55%) el contenido de ácido	

	Fluorescente, amarillo, azul, verde, rojo, radiación gamma y en ausencia de luz	ascórbico	
Vitaminas <sup>4</sup>	<b>Remojo:</b> Agua 8, 10, 12 h <b>Germinación:</b> 25°C/36,48, 60 h / HR = 70%		<b>Acido Ascórbico:</b> Incremento (0.8-9.9%) después de germinación
Minerales <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> 25°C/8 h <b>Germinación:</b> 25°C / 24, 72, 96 h	Incremento (4%) no significativo	Incremento (2.7%) no significativo
Minerales <sup>4</sup>	<b>Remojo:</b> Agua 8, 10, 12 h <b>Germinación:</b> 25°C/36,48,60 h / HR = 70%		<b>Remojo:</b> Disminuyeron <b>Fe</b> (-6.9-6.4%), <b>Ca</b> (-153-145%), <b>Zn</b> (-2.8-2.74%). <b>Germinación:</b> No se observaron cambios

<sup>1</sup>Khalil y col (2007), <sup>2</sup>Fernández-Orozco y col (2009), <sup>3</sup>Kattak y col (2007), <sup>4</sup>Bains y col (2011)

### **3 Efecto de la germinación de garbanzo sobre fitoquímicos y propiedades nutraceuticas**

#### **a Fitoquímicos**

López-Amorós y col (2006) reportaron que la germinación de leguminosas tiene un efecto sobre la cantidad y calidad de compuestos fenólicos y que los cambios dependen del tipo de leguminosa y de las condiciones de germinación; estos cambios generan cambios en actividad antioxidante y pueden influir sobre propiedades nutraceuticas.

Fernández Orozco y col (2009) reportaron que durante la germinación de garbanzo se observaron incrementos en contenido de compuestos fenólicos (+83 - 155%), capacidad de atrapar radicales peroxilo (+16-55%) y la capacidad antioxidante (evaluada por TEAC) (+12-23%); además, reportaron una ligera inhibición en la peroxidación de lípidos. La concentración alta de compuestos fenólicos totales contribuye a la capacidad antioxidante total.

Ghiassi y col (2012) estudiaron el efecto de la germinación de garbanzo sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante; ellos utilizaron extractos acetónicos, metanólicos y hexánicos. Observaron un incremento en el contenido de compuestos fenólicos, por efecto de la germinación, según el extracto evaluado: Acetónico (+53.7%), hexánico (60.1%), metanólico (92.8%).

Wu y col (2012) reportaron que del amplio espectro de isoflavonas que tiene el garbanzo germinado las principales son Biocanina A (4-,metil éster de Genisteína), Formononetina (4-metil éster de Diadzeína) y sus formas glicosiladas [Sissotrina (glicósido de Biocanina A), Ononina (glicósido de Formononetina)].

Gharachorloo y col (2013) evaluaron el efecto de la germinación de diferentes leguminosasa (frijol blanco, frijol común Vetch, lenteja, garbanzo) sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante mediante el retraso de oxidación de las grasas y la estabilidad oxidativa de la muestra. Reportaron que el bioproceso de germinación incrementó (+ 112.4 %) la estabilidad oxidativa de la muestra; concluyeron que las harinas de leguminosas germinadas, o sus

extractos, pueden ser utilizados como ingredientes o como antioxidantes naturales en nuevas formulaciones de alimentos funcionales.

Hayta & Iscimen (2017) optimizaron mediante metodología de superficie de respuesta, el proceso para la extracción de compuestos antioxidantes en germinados de garbanzo, utilizando la extracción asistida por ultrasonido. Los germinados de garbanzo fueron sometidos a diferentes parámetros de extracción, logrando obtener altos valores de compuestos fenólicos, y alta actividad antioxidante, confirmando que la germinación mejora la actividad antioxidante y que la extracción optimizada provoca mejores resultados que la extracción convencional.

En el **Cuadro 10** se presenta el efecto de la germinación de garbanzo y otras leguminosas sobre el contenido de isoflavonas.

#### **b Propiedades nutracéuticas**

Geervani (1991) reportó que, en estudios realizados con ratones, el garbanzo germinado evidenció ser un efectivo controlador de los niveles de colesterol en sangre.

Ghiassi y col (2012) estudiaron la actividad antioxidante (aplicando la metodología de actividad eliminadora de radical hidroxilo) de extractos (acetónicos, hexánicos, metanólicos) de garbanzo germinado. En extractos de semillas de garbanzo crudo la menor (15%) y mayor (78%) actividad antioxidante correspondieron a extractos metanólicos y acetónicos, respectivamente; esta diferencia podría deberse a la polaridad del solvente y al tipo de compuestos extraídos. Se observó un incremento (+3.8 - 493 %) en actividad antioxidante como consecuencia del proceso de germinación; los extractos metanólicos de garbanzo bioprocesado presentaron la mayor actividad antioxidante

Wu y col (2012) evaluaron el efecto de la germinación de garbanzo sobre la actividad antioxidante; ésta se evaluó por el método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). Reportaron que la capacidad antioxidante se incrementó de 874 a 2,457  $\mu\text{mol ET}/100\text{g bs}$ , como

**Cuadro 10.** Efecto de la germinación de garbanzo y otras leguminosas sobre el contenido de isoflavonas

<b>Material</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Garbanzo germinado <sup>1</sup>	Aislar y caracterizar isoflavonas de semillas de garbanzo germinado	Se aislaron siete isoflavonas: Biocanina A, Calicosina, Formononetina, Genisteina, Trifolirhizina, Ononina, Sissotrina	Principales isoflavonas: Biocanina A y Formononetina. La presencia de isoflavonas sugiere que el garbanzo germinado posee buen potencial biológico.
Garbanzo y brotes de garbanzo germinado <sup>2</sup>	Evaluar el efecto del Se y Na y la germinación sobre el contenido de Se, Formononetina y Biocanina A	Garbanzo germinado en 25-50 mg/L de Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> aumento el contenido de selenio y presento un buen nivel de isoflavonas. Los granos germinados con solo agua presentaron una mayor concentración de Formononetina y Biocanina A	Brotes enriquecidos con Se (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ; 50 mg/L en condiciones de 6 días, 28°C) pueden servir como una fuente importante de Se e isoflavonas
Frijol negro germinado <sup>3</sup>	Caracterizar y cuantificar saponinas y flavonoides en brotes, testa y cotiledones de frijol negro germinado	El principal flavonoide asociado a frijol negro (Quercetina 4-O galactosidasa) negro se detectó en testa. La concentración de flavonoles fue afectada por el remojo (1/3 de la cantidad inicial permanece después del remojo). Genisteína fue detectada después de tres días de germinación. Las saponinas se encontraron en mayor cantidad en el hilum y se incrementaron de 2-3 veces tras el primer día de germinación	Formas de aglicona se detectaron después del remojo debido a la actividad enzimática de glicosidasas. La presencia de agliconas en los brotes evidencia la eficacia de la germinación

<sup>1</sup> Zhao y col (2009), <sup>2</sup> Zhang y col (2011a), <sup>3</sup> Guajardo Flores y col (2012)

consecuencia de la germinación. El proceso de germinación también incremento el contenido de compuestos fenólicos. Ver **Cuadro 11**.

Ma y col (2013) llevaron a cabo un estudio en relación a la actividad estrogénica de germinados de garbanzo. Se evaluó el efecto de un extracto de isoflavonas de garbanzo germinado en ratas ovariectomizadas. Los resultados evidenciaron un importante efecto estrogénico en el útero de los ratones; la administración oral del extracto de isoflavonas de garbanzo germinado tuvo un efecto significativo, de manera dosis dependiente, se restauró la estructura uterina y la circulación de Estradiol, hormona folículo estimulante y hormona luteinizante, así como la prevención de la pérdida ósea. El contenido elevado de fitoestrógenos presentes en el extracto de isoflavonas de garbanzo germinado podría usarse como una terapia alternativa para aminorar los síntomas de la menopausia y prevenir la pérdida ósea causada por la deficiencia de estrógenos en la menopausia.

Las isoflavonas extraídas de leguminosas, como el garbanzo, recientemente han recibido atención por sus diversas actividades biológicas como antiestrogénica, antioxidante, antimicrobial, anticardiovascular, anticáncer y antiosteoporosis; el garbanzo germinado podría ser utilizado como alimento funcional por ser una buena fuente de isoflavonas y otros compuestos bioactivos (Wu y col, 2012).

**Cuadro 11.** Efecto de la germinación de garbanzo sobre actividad antioxidante

<b>Material</b>	<b>Condiciones de germinación</b>	<b>Actividad antioxidante (AAox)</b>
Garbanzo <sup>1</sup>	<b>Remojo:</b> Agua dest 5.5 h <b>Germinación:</b> Oscuridad / HR=99%, 2 y 3 d <b>Secado:</b> Liofilización	La germinación incrementó AAox evaluada por SOD-LA (47–41%), PRTC (16–55%) y TEAC (12–23%)- Se observó una ligera inhibición en AAox cuantificada por LPI. Las harinas de garbanzo germinado pueden ser utilizadas como ingredientes para nuevos formulaciones de alimentos funcionales
Garbanzo <sup>2</sup> Frijol blanco, lenteja y arveja	<b>Desinfección:</b> Hipoclorito Na 0.07% -- 30 min <b>Remojo:</b> Agua destilada 5 h (agitación cada 30 min) <b>Germinación:</b> 20°C/5 d <b>Secado:</b> 50°C / 5 h	Incrementos en el contenido de compuestos fenólicos y el retraso en la oxidación. Las harinas de leguminosas germinadas y/o sus extractos pueden ser utilizadas como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales
Garbanzo <sup>3</sup>	<b>Desinfección:</b> Hipoclorito Na 0.07% -- 30 min <b>Remojo:</b> agua dest / 5 h (agitación cada 30 min) <b>Germinación:</b> 20°C / 5 d / Sin luz	La germinación incrementó AAox de garbanzo. El extracto metanólico de garbanzo germinado mostró mayor AAox que los extractos acetónico y hexánico. El bioproceso promueve el desarrollo de otros compuestos antioxidantes como vitaminas

<sup>1</sup> Fernández Orozco y col (2009), <sup>2</sup> Ghiassi Tarzi y col (2012), <sup>3</sup> Gharachorloo y col (2013)



#### **IV JUSTIFICACIÓN**

La germinación es un bioproceso conveniente para incrementar el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y actividad antioxidante (AAox) en leguminosas. En garbanzo, uno de los principales compuestos bioactivos son los ácidos fenólicos [Cumárico, Ferúlico, Sinápico, Elágico, Siríngico]. Los ácidos fenólicos en leguminosas se han relacionado con diversas actividades biológicas (antiinflamatorio, anticancerígeno, antimutagénesis). Es pertinente evaluar el efecto de las condiciones de germinación sobre CFT, FT, AAox, contenido de ácidos fenólicos y propiedades nutraceuticas (Inhibición de proliferación de células de cáncer de mama). Es posible generar harinas de garbanzo bioprocesado que podrían ser utilizadas como alimentos / ingredientes funcionales.

## V OBJETIVOS

### A OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las condiciones de germinación para llevar a cabo el bioprocesamiento para mejorar los potenciales antioxidante y antiproliferativo de células de cáncer de mama e identificar compuestos bioactivos relacionados con estos potenciales.

### B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Optimizar el bioproceso de germinación de garbanzo para obtener harinas de garbanzo bioprocesado (**HGB**) con contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales, y actividad antioxidante altos. Se les reconoce como **HGB** optimizada = **HGBO**
- (2) Evaluar composición química y compuestos bioactivos (taninos, saponinas) de **HGBO**
- (3) Evaluar los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales, actividad antioxidante (ORAC, ABTS) de **HGBO**
- (4) Evaluar los niveles y perfiles de ácidos fenólicos de **HGBO**
- (5) Evaluar el efecto del extracto de **HGBO** sobre la actividad antioxidante celular
- (6) Estudiar el efecto de extractos de **HGBO** sobre la proliferación de células de cáncer de mama, inducción de apoptosis y efecto citotóxico en morfología celular.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### A MATERIALES

Se utilizó garbanzo (*Cicer arietinum* L), tipo desi pigmentado (negro), genotipo ICC 3761 de la temporada otoño-invierno 2014-2015. Los granos después de cosechados se limpiaron y almacenaron en bolsas de polietileno las cuales se colocaron en recipientes de plástico, con cierre hermético, y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231, y de fibroblasto de ratón; esta última como control de especificidad de los extractos sobre líneas celulares de cáncer de mama. Para la evaluación de actividad antioxidante celular se emplearon célula de hepatocarcinoma Hep-G2.

### B MÉTODOS

#### 1 Obtención de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB)

Para la obtención de harinas de garbanzo bioprocesado (germinado) se aplicó la metodología reportada por Perales-Sánchez y col (2014) con algunas modificaciones. El bioproceso de germinación se optimizó para obtener harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) con contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y actividad antioxidante (AAox) altos. La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), como herramienta de optimización, se aplicó sobre tres variables de respuesta (CFT, FT, AAox) para obtener valores máximos de cada una de ellas. Se utilizó un diseño central compuesto con dos factores [Temperatura de germinación (TG, 20-35°C), tiempo de germinación (tG, 10-240 h)] en cinco niveles; el diseño generó 13 tratamientos (**Cuadro 12**).

Para llevar a cabo cada uno de los 13 tratamientos se utilizaron lotes de 200 g de semillas de garbanzo. Los granos se desinfectaron en disolución de hipoclorito de sodio 0.1% /10 min, se drenaron, enjuagaron y posteriormente, se remojaron

**Cuadro 12.** Diseño experimental<sup>a</sup> utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura / tiempo de germinación (TG, tG) para producir harinas de garbanzo bioprocesado (HGB)

Ensayo <sup>b</sup>	Variables de Proceso		Variables Respuesta		
	TG (°C)	tG (h)	CFT <sup>c</sup>	FT <sup>d</sup>	AAox <sup>e</sup>
1	32.8	206.3	?	?	?
2	22.2	43.6	?	?	?
3	27.5	125	?	?	?
4	27.5	125	?	?	?
5	32.8	43.6	?	?	?
6	27.5	10	?	?	?
7	27.5	240	?	?	?
8	20	125	?	?	?
9	35	125	?	?	?
10	27.5	125	?	?	?
11	27.5	125	?	?	?
12	27.5	125	?	?	?
13	22.2	206.3	?	?	?

<sup>a</sup> Diseño central compuesto con dos factores y cinco niveles; 13 ensayos .

<sup>b</sup> No corresponden al orden de procesamiento

<sup>c</sup> mg equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100 g muestra (bs)

<sup>d</sup> mg equivalentes de quercetina (EQ) /100 g muestra (bs)

<sup>e</sup> μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g (BS )

en agua destilada (25°C/8 h). Se usaron charolas plásticas para germinar las semillas hidratadas y la cámara de germinación o incubadora. Los germinados obtenidos de cada uno de los 13 tratamientos (**Cuadro 12**) se liofilizaron (Freeze Dry Systems Modelo 77520, LABCONCO) y molturaron para obtener 13 harinas de garbanzo bioprocesado (**HGB**). Las **HGB** se empacaron en bolsas plásticas y almacenaron en recipientes herméticos a 4°C hasta su utilización.

Para la obtención de los datos experimentales, que permitieron optimizar el proceso de germinación de garbanzo, las **HGB** se evaluaron para contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**), flavonoides totales (**FT**) y actividad antioxidante (**AAox**).

## **2 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y actividad antioxidante (AAox) de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB)**

### **a Extracción de fitoquímicos libres**

La extracción de fenólicos libres se realizó según el método descrito por Adom y Liu (2002). A una muestra de un gramo se le agregaron 10 mL de etanol al 80% (v/v); esta suspensión se agitó en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) velocidad 50 rpm/10 min. La suspensión se centrifugó (3,000xg / 10°C / 10 min) (Sorvall RC5C. Sorvall Instruments, Dupont, Wilmington, de, USA) El sobrenadante se concentró a 35°C a presión baja (Savant SC250EXP Speed Vac Plus centrifugal, Holbrook, NY, USA) hasta alcanzar un volumen final de 2 mL. El concentrado se almacenó a -20°C hasta su utilización. La extracción se realizó por triplicado.

### **b Extracción de fitoquímicos ligados**

La extracción de fitoquímicos ligados se llevó a cabo acorde a Adom y Liu (2002) con algunas modificaciones. El residuo (pellet) remanente de la extracción de fitoquímicos libres, fue hidrolizado con 10 mL de NaOH 2M y sometido a tratamiento térmico en baño María con agitación (95°C / 30 min/ 60 rpm), posteriormente, se agitó a temperatura ambiente (25°C/ 60 min). La mezcla se

neutralizó con 2 mL de HCl concentrado, y se le agregaron 10 mL de hexano, se agitó y centrifugó (3000 xg/10°C/10 min) y se descartó el sobrenadante para remover lípidos. El precipitado (pellet) resultante se trató con 10 mL de acetato de etilo, se sometió a agitación y centrifugación (3000xg/10°C/10 min), el sobrenadante se recolectó en un tubo cónico y se concentró el producto de cinco repeticiones. La fracción de acetato de etilo se evaporó a sequedad (Savant SC250EXP Speed Vac Plus centrifugal, Holbrook, NY, EUA). Los compuestos fenólicos ligados se reconstituyeron con 2 mL de metanol al 50% y almacenaron a -20°C hasta su utilización. La extracción se llevó a cabo por triplicado.

### **c Compuestos fenólicos totales (CFT)**

Para evaluar la concentración de fenólicos totales de los extractos obtenidos anteriormente, se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col (1999). En una placa de 96 pozos, se colocaron 20 µL del extracto de fitoquímicos libres y ligados de cada uno de los tratamientos. Tanto a la solución estándar de ácido Gálico como a los compuestos bioactivos libres y ligados de cada tratamiento, se les agregaron 180 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 50 mL de NaCO<sub>3</sub> al 7%, se incubaron (25°C/90 min) en el mismo equipo y se midió la absorbancia a 750 nm en un Lector de Microplacas (Synergy HT Biotek Instrument). Se utilizó metanol como blanco. El contenido de **CFT** se calculó como la suma de compuestos fenólicos presentes en fitoquímicos libres y ligados y se expresó como microgramos equivalentes de ácido Gálico (EAG) por 100 g de muestra seca (µg EAG/100 g). El rango de linealidad de la curva de calibración de ácido Gálico fue de 25 a 300 ppm. Las determinaciones se evaluaron por triplicado.

### **d Flavonoides totales (FT)**

El contenido de flavonoides totales (suma de flavonoides en extractos de fitoquímicos libres y ligados) se determinó aplicando la metodología descrita por Heimler y col (2005) y Xu y col (2007) con algunas modificaciones. A una alícuota

de 30  $\mu\text{L}$  de extractos de fitoquímicos libres y ligados y una de la solución estándar de Quercetina (+), se agregó 120  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se mezcló con 9  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  al 5%. Después de 6 min se adicionaron 18  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y se dejó reposar 5 min, después se adicionaron 60  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  1M y, por último, se agregaron 110  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se evaluó la absorbancia a 510 nm contra un blanco usando un espectrofotómetro visible UV con lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Quercetina / 100 g de muestra. El contenido de flavonoides se calculó mediante la suma de flavonoides presentes en extractos de fitoquímicos libres y ligados. El rango de linealidad de la curva de calibración fue de 25 a 300 ppm ( $r=0.99$ ). La determinación se realizó por triplicado.

#### **e Actividad antioxidante (AAox)**

La determinación de la AAox se llevó cabo por el método de capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) desarrollado para compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Cao y col, 1993 y 1995; Ou y col, 2001; Wu y col, 2004). Se utilizó el compuesto 2-2'-azobis amidinopropano (AAPH) que mediante la degradación térmica produce radicales peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, Diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, Diclorofluoresciscina (DFC). El grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) de atrapar o secuestrar a los radicales libres fue util para calcular la actividad antioxidante. Los extractos se evaluaron frente a un patrón de Trolox de cinco puntos (concentración de 25 a 100  $\mu\text{M}$ ). Los resultados de AAox se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox (TE) / 100 g de muestra de peso seco (bs). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

La preparación de la solución de AAPH, se realizó de la siguiente manera: 0.207 g del reactivo se aforó en un matraz volumétrico de 5 ml con solución reguladora de fosfato (pH 7.4). La fluoresceína se preparó a una concentración de 0.1 mM con solución reguladora de fosfato (pH 7.4), hasta el final (ya que en condiciones ambientales puede oxidarse lentamente). Para la preparación de las

muestras a analizar, se realizaron diluciones a cada una de los extractos, tanto libres como ligados usando solución reguladora de fosfato (pH 7.4). Posteriormente se transfirieron 25 µl de cada dilución y de cada punto de la curva de Trolox (por triplicado) a una placa de 96 pozos, la cual, previamente había sido cargada con 180 µl de agua destilada únicamente en los pozos de las orillas de la placa. La placa con las muestras se colocó en el lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument) del espectrofotómetro fluorescente; por medio del autodispensador del equipo se agregaron 150 µl de Fluoresceína a cada pozo del microplato, la solución se mezcló y agitó (1,200 rpm/20 segundos). La reacción inició agregando 25 µl de AAPH por medio del autodispensador del equipo previamente programado. La reacción se realizó a 37°C y la fluorescencia se midió a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión.

Los datos se recolectaron por el software del equipo. La reacción con los radicales peroxilo generó la pérdida de la fluorescencia con el tiempo como se indica con la siguiente reacción de los radicales peróxilo con los compuestos fluorescentes. El efecto de un antioxidante se integró por el área neta bajo la curva sobre la pérdida de la fluorescencia (AUC) [ $AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}$ ]. El área bajo la curva se calculó con la siguiente ecuación:

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 \dots + f_i/f_4) \times CT$$

Los Trolox equivalentes de la muestra se calcularon usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática ( $Y = a + bX$ , lineal; o  $Y = a + bX + cX^2$ , cuadrática) entre la concentración de Trolox (Y) (µM) y el área neta bajo la curva de la disminución de la fluoresceína (X) ( $ABC_{muestra} - ABC_{blanco}$ ). La regresión lineal se aplicó en un rango de 100-25 µM de Trolox.

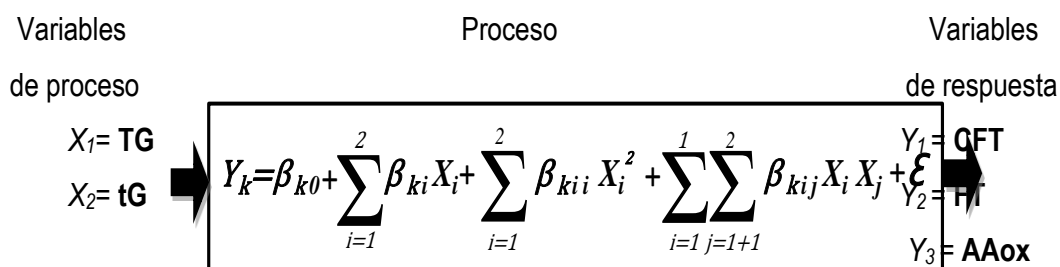
### **3 Optimización del proceso de germinación de grano de garbanzo**

#### **a Diseño experimental y análisis estadístico**

Se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta, como técnica de optimización, para definir condiciones óptimas de germinación para la producción



de harina de garbanzo desi bioprocesado (germinado) (HGB) con capacidad antioxidante alta. Datos de la literatura y ensayos preliminares se consideraron para seleccionar el número y niveles de variación de las variables de proceso en el diseño experimental. Se seleccionó un diseño experimental central compuesto con dos factores [Temperatura de germinación (TG) / tiempo de germinación (tG)] y cinco niveles (dos factoriales, dos axiales, un central) (Myers, 1971; Khuri & Cornell, 1987). Las variables de proceso consideradas fueron: temperatura de germinación ( $X_1=$ TG, 20-35°C) y tiempo de germinación ( $X_2=$  tG, 10-240 h). Como variables de respuesta: Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y actividad antioxidante (AAox). El modelo empírico de la “caja negra” a continuación representa la relación entre variables de proceso (TG, tG) y variables de respuesta (CFT, FT, AAox)



La expresión dentro de la “caja negra” representa CFT, FT y AAox cuando  $k=1, 2$  y  $3$  respectivamente;  $\beta_{k0}$ ,  $\beta_{ki}$ ,  $\beta_{kii}$  y  $\beta_{kij}$  representan la constante y los coeficientes de los efectos lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente;  $X_i$ ,  $X_i^2$  y  $X_i X_j$  representan los efectos lineal, cuadrático y de interacción de la variables independientes, respectivamente; y  $\epsilon$  representa el error, primariamente considerado por la incapacidad para determinar el modelo verdadero. Aplicando el proceso de regresión, los términos no-significativos ( $p \leq 0.1$ ) se eliminaron del polinomio de segundo orden, se calculó un nuevo polinomio y se obtuvo un modelo de predicción para cada variable de respuesta (Myers, 1971; Khuri &

Cornell, 1987). Los resultados se sometieron a análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por la aplicación de la prueba de rango múltiple de Duncan, con un nivel de significancia del 0.05, para comparación de medias. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa STAT-EASE (Design Expert, 2007).

#### **b Optimización del proceso de germinación de garbanzo**

Se aplicó el método convencional gráfico para obtener valores máximos de **CFT**, **FT** y **AAox**. Los modelos de predicción de cada una de las variables de respuesta se utilizaron para representar gráficamente el sistema. La sobreposición de gráficas de contorno de cada una de las variables de respuesta permitió obtener una gráfica de contorno para la observación y selección de la mejor (óptima) combinación de **TG** y **tG** para la producción de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (**HGBO**) con valores máximos de **CFT**, **FT** y **AAox**. Para realizar esta operación, se utilizó el programa Design Expert (V 7.0.0) (Design Expert, 2007).

### **4 Composición química de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)**

La composición química se determinó a la harina de garbanzo integral crudo (HGIC) y en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO). Ambas muestras se presentaron en forma de harina que pase a través de malla 80 (0.180 mm).

#### **a Proteína cruda**

Se determinó acorde al método 960.52 de AOAC (1999), a partir de nitrógeno total utilizando un factor de 6.25 (microKjeldahl). La digestión se realizó con ácido sulfúrico concentrado en un sistema Kjeltex (Mod 1009 y 1002, Tecator, Suecia). Se digirió 0.2 g de harina de garbanzo integral con 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una

temperatura de 200°C. Después de la digestión la muestra se diluyó con 25 mL de agua y se destiló utilizando disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% para recibir el destilado. La titulación se llevó a cabo con una disolución de HCl 0.1 N. La prueba se realizó por triplicado.

#### **b Grasa cruda**

Se empleó un gramo de muestra a la cual se le extrajo la fracción lipídica utilizando como solvente éter de petróleo (70°C/ 4h) según el método 30.25 de la AOC (1998). Se empleó un sistema Soxtec (Mod 1043, Tecator, Suecia).

#### **c Minerales**

Se determinó de acuerdo con el método 32.10 de la AOAC (1998). El contenido de minerales se calculó a partir de la pérdida de peso de 2 g de muestra después de incineración en una mufla (Felisa mod FE 330, México) a 550°C durante 3 h.

#### **d Carbohidratos**

Se determinó por diferencia con 100% tomando en cuenta los porcentajes de proteína, grasa y minerales.

#### **e Fibra dietaria total (FDT)**

Se determinó de acuerdo al método oficial 985.29 (AOAC 1999), mediante un kit de análisis de fibra dietaria total (TDF-100<sup>a</sup>, Sigma), se realizaron cuatro replicas de un g de muestra cada una, previamente desgrasadas. Las muestras se colocaron en un vaso de precipitado de 300 mL y se le agregaron 50 mL de una solución reguladora de fosfatos (pH 6) a cada muestra. A cada vaso con la muestra se adicionaron 100 µL de α amilasa. Las muestras se sometieron a tratamiento térmico por (95 °C/ 15 min) en agitación constante. Después de ese tiempo, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 0.275 M o HCL 0.25 M. Se adicionaron 100 µL de una solución de proteasa (5 mg proteasa) a cada muestra y se sometieron a 60°C por 30 min.

Finalmente, las muestras se enfriaron y filtraron usando para ello filtros Gösh #2 previamente secos con 0.5 g de celita, a peso constante), se realizaron tres lavados con 20 mL de etanol al 78%, cuatro lavados con etanol al 95% y finalmente uno con acetona. El residuo del filtrado se secó en una estufa a 70°C/12 h. para la obtención de la fracción insoluble.

Al sobrenadante de la fracción insoluble se le adicionaron 200 mL de etanol al 98% se dejó en reposo (12 h/ 4°C) y se filtró (Gösh #2 con 0.5 g de celita); al precipitado se le practicaron lavados con etanol al 78% y 95%. El filtro con el residuo se secó en una estufa a 70°C/12 h, para la obtención de la fracción soluble. Se registraron los pesos de la fracción insoluble y soluble; se tomaron dos muestras de cada fracción para cuantificar proteínas y dos para cuantificar cenizas. El porcentaje de fibra de la fracción insoluble y soluble se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ FI y/o FS} = \left[ \frac{\text{PRFS} - \text{Proteína} - \text{Cenizas}}{\text{PMI}} \right] * 100$$

Donde: **FI**= Fibra insoluble, **FS**= Fibra soluble, **PRFS**= Peso del residuo final seco  
**PMI**= Peso de la muestra inicial.

## **5 Contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)**

A la harina de garbanzo bioprocesado optimizada (**HGBO**) se le evaluó contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**), flavonoides totales (**FT**) y actividad antioxidante (**AAox**) hidrofílica total acorde a las metodologías descritas en las secciones **VI.B.2.c**, **VI.B.2.d** y **VI.B.2.e**, respectivamente, de este documento. Además, se les cuantificó taninos condensados (TC), saponinas, actividad antioxidante (ABTS y ORAC). La harina de garbanzo integral crudo (**HGIC**) se usó como referencia.

### **a Taninos condensados (TC)**

El contenido de taninos condensados de los extractos HGBO se determinó acorde al método de Xu y col (2007). Se empleó una alícuota de 20 µL de

extractos de HGBO, HGIC, y una de la solución estándar de catequina-(+) y se mezcló con 1200  $\mu$ L de vainillina al 4% en metanol y 600  $\mu$ L de HCl concentrado y se dejó en reposo durante 15 min. Se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco usando un espectrofotómetro visible UV con lector de microplatos (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek Inc., Winooski, VT, EUA). Los resultados se calcularon y expresaron como mg equivalentes de catequina/ 100g de muestra. El rango de linealidad de la curva de calibración fue de 25 a 500 ppm ( $r=0.99$ ). La determinación se realizó por triplicado.

## **b Saponinas**

Para la cuantificación de saponinas, se utilizó la metodología propuesta por Hiai (1976), mediante el uso de la vainillina y  $H_2SO_4$ , para la generación de grupos cromóforos en saponinas, los cuales son visibles en longitudes de onda alrededor de 455-460 nm. Se pesaron 0.5 g de HGIC y HGBO, se añadieron 10 mL de metanol acuso al 80% a cada uno de los tubos y se colocaron en agitación mecánica en un agitador orbital durante 16 h, se centrifugaron (5000 rpm/ 10 min) y se recolectó el sobrenadante en tubos de vidrio. Al pellet obtenido se le volvió a adicionar 5 ml de metanol al 80% y mediante centrifugación (5000 rpm 10 min) y el sobrenadante se recolectó junto al anterior.

Para la cuantificación de saponinas, a 200  $\mu$ L de extracto se agregaron 50  $\mu$ L de metanol al 80% a temperatura ambiente. Los tubos se transfirieron a un baño de hielo, ahí se les adiciono 0.25 mL del reactivo de vainillina (1.6 g de vainillina en 20 ml de metanol absoluto, preparado justo antes de la determinación) y 2.5 ml de ácido sulfúrico al 72% v/v (agregarlo lentamente, resbalando la solución por la pared del tubo) y agitando inmediatamente en vortex. La mezcla obtenida se calentó en un baño a 60°C 10 min. Se enfriaron los tubos en baño de hielo. Finalmente se midió la absorbancia a 520 nm contra un blanco de reactivos.

Los valores de absorbancia obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva tipo de Diosgenina, para obtener microgramos de Diosgenina por cada mL y finalmente los resultados se expresaron en mg equivalentes de Diosgenina por

100 g de muestra base seca. Para el estándar de diosgenina se pesaron 10 mg de diosgenina en 4 ml de agua destilada. Se añadieron 16 ml de metanol para obtener una concentración final de 0.5 mg/ml. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{mg eq Diosgenina/100g muestra} = [\mu\text{g/mL Diosgenina}] [20 \text{ mL/peso muestra(g)}] [(1 \text{ mg} \times 100) / 1000 \mu\text{g}]$$

### **c Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los compuestos bioactivos libres y ligados se midió usando el método de ORAC y el método de decoloración del radical ABTS, usando un lector de microplaca (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek Inc., Winooski, VT, EUA). Para ambos ensayos, los extractos fueron evaluados contra un estándar de trolox (Re y col., 1999; Ou y col., 2001). Los resultados de AAox fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox (ET)/100 g de muestra en base seca. Todas las mediciones fueron hechas por triplicado.

### **d Perfil de ácidos fenólicos**

La separación cromatográfica de extractos libres y ligados se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) (Perkin Elmer serie 1100, Inc, Alemania) equipado con una columna YMC-Pack ODS-AM-303 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y un detector de DAD. La fase móvil utilizada fue: (A) metanol y (B) agua / ácido trifluoroacético (99: 1 v / v). El gradiente de elución se estableció siguiendo el protocolo HPLC-DAD descrito por Irakli y col. (2012). La detección de los ácidos fenólicos se realizó a tres longitudes de onda diferentes: 260 nm (para los ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico, protocatecúico y elágico), 275 nm (para los ácidos gálico y syringico) y 320 nm (para cafeico, p-cumárico, ferúlico y sinápico) bajo una temperatura de columna de 25 ° C y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ . Las señales obtenidas del detector fueron integradas en el software Chromera (PerkinElmer Inc, Alemania). La identidad de cada compuesto en extractos de muestra se estableció comparando los tiempos de retención y los espectros UV

con sus respectivos estándares. Las concentraciones correspondientes a cada ácido fenólico se calcularon mediante interpolación de una curva estándar.

## **6 Actividad antioxidante celular con células de carcinoma hepatocelular (HepG2)**

### **a Cultivo de células Hep-G2**

Previo al cultivo, la campana de flujo laminar se limpió minuciosamente, se desinfectó con etanol al 70% y se sometió a luz ultravioleta (15 min). La línea celular HepG2 se sembró en medio de crecimiento (WME suplementado con suero fetal bovino al 5%, Hepes 10mM, 2 mM L-glutamina, 5 mg/ml de insulina, 0.05 mg/ml de hidrocortisona, 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 100 mg/ml de gentamicina) y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Wolfe y Liu, 2007). Las células se cambiaron de botella cada 2 o 3 días al alcanzar la confluencia deseada del 80%. Las células HepG2 se mantuvieron a una concentración usadas para los experimentos posteriores corresponden a los pases entre 21 y 40.

### **b Ensayo de citotoxicidad**

Se realizó una prueba de citotoxicidad de los extractos libres y ligados sobre células HepG2 utilizando el ensayo de azul de metileno modificado por Felice y col (2009). Las células HepG2 se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^4$  células por pozo en una placa de 96 pozos en 100 µL de medio de cultivo de crecimiento y se incubaron durante 24 h en condiciones controladas (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>). Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. Se añadieron a cada pozo 100 µL de extractos libres y ligados en medio de tratamiento (WME complementado con 2mM de L-glutamina y 10mM Hepes) a diferentes concentraciones; como control positivo se utilizaron pozos que contenían solo medio de cultivo. Después del periodo de incubación, el extracto se eliminó y las células adheridas a la placa se lavaron con PBS. Posteriormente las células se trataron con una solución de

azul de metileno (98% HBSS, 0.67% de glutaraldehído, 0,6% de azul de metileno) y se incubaron por una hora a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la tinción de azul de metileno, la placa se dejó secar al aire antes de añadir 100 µL de solución de elución (49% PBS, etanol 50%, ácido acético al 1%) a cada pozo. La microplaca se colocó en un agitador de sobremesa por 20 min para permitir una elución uniforme. La absorbancia se registró a 570nm con sustracción de blanco utilizando un lector de microplaca (Synenrgy™ HY Multi-Detection, Bio Tek, Inc, Winooski, VT, EUA). Las diferentes concentraciones de los compuestos libres y ligados que disminuyeron la absorbancia más de 10% en comparación con el control, se consideraron citotóxicas.

### **c Actividad antioxidante celular (AAox<sub>celular</sub>)**

Previamente se prepararon las siguientes soluciones: (i) Solución stock 20 mM de 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) en metanol, se almacenó a -20°C, (ii) Solución stock de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (ABAP) 200mM, almacenada a -40°C hasta su utilización, (iii) Quercetina 20 µM se utilizó como estándar. La actividad antioxidante se expresó como micromoles equivalentes de Quercetina. Para el ensayo de **AAox<sub>celular</sub>**, las células HepG2, se sembraron en placa de 96 pozos a una densidad de 6x10<sup>4</sup>/pozo en 100 µL de medio de cultivo de crecimiento. Los pozos externos se llenaron con 100 µL de PBS para crear una atmósfera de humedad para evitar evaporación de los extractos y mantener la temperatura constante en toda la microplaca. Después de 24 h de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, se eliminó el medio de crecimiento y las células se lavaron con 100 µL de PBS estéril. Los pozos se trataron durante 1 hora con 100 µL extracto o quercetina a diferentes concentraciones en medio de tratamiento y 25 mM de DCFH-DA. Para determinar la eficacia de la absorción celular o la unión a la membrana celular de los fitoquímicos se llevaron a cabo dos protocolos, uno con lavado de PBS y otro sin el. Una vez que se realizó el protocolo con y sin PBS, se añadió 100 µL de AAPH (600 mM) en HBSS (solución buffer de Hanks) sin rojo fenol a cada pozo. La placa se colocó inmediatamente en



el lector de microplaca pre-calentado a 37°C. Para la generación de la cinética, se utilizó el filtro de emisión de 485 nm y filtro de excitación de 528 nm. La lectura de fluorescencia se tomó cada 5 minutos durante 1 hora. En cada placa también se incluyeron pozos de control y de blanco. Los pozos de control contenían medio de tratamiento con DCFH-DA y HBSS con AAPH, mientras que los pozos del blanco contenían medio de tratamiento con DCFH-DA y HBSS sin AAPH (Wolfe y Liu, 2007).

#### **d Cuantificación de $AAox_{celular}$ y determinación de $EC_{50}$**

La concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) es la dosis requerida del extracto para causar una inhibición de 50% de la fluorescencia emitida por la DCFH-DA. Después de las lecturas en el espectro se integró el área bajo la curva de la fluoresceína contra el tiempo para cada concentración de extracto utilizado, calculado con la siguiente fórmula:

$$AAox_{celular} = [100 - ( \int SA / \int CA )] \times 100$$

Donde:  $\int SA$  = Integración del área bajo la curva de la fluorescencia frente al tiempo de cada extracto,  $\int CA$  = Integración del área bajo la curva del control. La concentración media efectiva ( $EC_{50}$ ) de los extractos de harina de garbanzo sin procesar y bioprocesada se calculó por el gráfico de efectos medios del log (fa/fu) frente a los log de la dosis, donde fa es la fracción afectada por el tratamiento (unidades  $AAox_{celular}$ ) y fu es la fracción no afectada por el tratamiento. Los valores de  $EC_{50}$  se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar utilizando conjuntos de datos por triplicado obtenidos a partir del mismo experimento. Los valores de  $EC_{50}$  se convirtieron a valores de  $AAox_{celular}$ , que se expresaron como micromoles equivalentes de Quercetina  $\mu M$  (EQ)/100 g de muestra, utilizando el valor medio de  $EC_{50}$  de la quercetina a partir de tres experimentos separados (Wolfe y Liu, 2007).

## **7 Actividad anticarcinogénica en células de cáncer de mama triple negativo**

### **a Cultivo de líneas celulares**

Se utilizó una línea celular de cáncer de mama triple negativo (**MDA-MB231**) y otra línea celular no transformada de fibroblasto de ratón (**NIH-3T3**) utilizadas para estudiar la especificidad de los extractos hacia la proliferación de células cancerosas. Las células, contenidas en tubo Eppendorf y mantenidas en congelación (-80°C), se descongelaron rápidamente en baño María (37°C). Una vez descongeladas se tomó una alícuota y se sembró en un frasco de cultivo con 10 mL de medio Eagles Modificado por Dulbeco's (DMEM), 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina). Se incubó a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar un nivel de confluencia de 80-90% (36-48 h). Las células MDAMB231 usadas en los ensayos corresponden a los pases entre 5 y 10, mientras que las NIH3T3 a los pases 25 y 35.

### **b Evaluación del efecto citotóxico sobre morfología celular**

Los cambios en la morfología celular de las células de cáncer de mama MDA-MB231 después de la exposición al extracto de HGIC y HGBO se examinaron usando una doble tinción con marcadores fluorescentes: dapi (específico para ADN) y faloidina (específico para filamentos de actina). Se sembraron células a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pozo, en una placa de 8 pozos por 24 h hasta alcanzar confluencia. Una vez que se probaron los extractos de HGIC y HGBO, las células se fijaron con formaldehído 4% por 30 min y se permeabilizaron con Triton 0.2% para posteriormente realizar la doble tinción, en oscuridad. Para observar los cambios morfológicos de las células se utilizó un microscopio fluorescente, (filtros de excitación de 353 y 535 nm y de emisión 460 y 585 nm) para dapi y faloidina respectivamente. Se utilizaron controles positivos (antineoplásico cisplatino 40  $\mu$ M) y negativo (células sin tratamiento), para efectos de comparación.

### **c Ensayo de inhibición de proliferación de células de cáncer de mama**

Para determinar la concentración a la cual se inhibe la proliferación de células de cáncer de mama se utilizó la técnica de Xu y Chang en (2009) con algunas modificaciones leves. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ L de una suspensión con  $2 \times 10^4$  células/ml por cada línea celular, al menos 12 h antes de agregar los extractos, estos fueron resuspendidos en medio cultivo. Las concentraciones de extracto que se probaron fueron: **0.3, 0.5, 1, 5, 10 y 15 mg/ml**. Se incubaron (37°C/12h) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se determinó la viabilidad celular usando 10  $\mu$ L de MTT (Cell growth determination Kit MTT based; Sigma) y se midió la absorbancia a 570 nm. La inhibición del crecimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{células sin tratar}} - A_{\text{células tratadas}}) / A_{\text{células sin tratar}}] \times 100$$

Donde: **A**=Absorbancia a  $\lambda=570$  nm

#### **d Determinación de apoptosis mediante Anexina V-FITC/IP (Ioduro de Propidio)**

Se llevó a cabo según la metodología de Banafa y col (2013). Las líneas celulares de cáncer de mama DMA-MB-231 y la línea no transformada utilizada como control se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos a una concentración de ( $1 \times 10^4$  células /pozo) y se cosecharon a las 24 h, después se colocaron en y sin contacto con el extracto (**HGIC, HGBO**) a diferentes concentraciones, las células se tiñeron con una solución de Anexina (Anexina V-fluorescente en solución reguladora con Ioduro de Propidio). Las placas se incubaron por 15 min en oscuridad, para posteriormente analizarse por Citometría de Flujo para la obtención de imágenes, para determinar morfología apoptótica de condensación de núcleos, fragmentación o células Anexina positiva; se utilizará un flujo Jo 7.6.1 software.

#### **9 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y las medias de los resultados se compararon

con la prueba de rango múltiple de Duncan, con un nivel de significancia del 0.05 (Sg-Plus 6.0). Para determinar el efecto del procesamiento sobre la actividad antioxidante y el potencial nutracéutico se utilizó un diseño unifactorial.

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A MODELOS DE PREDICCIÓN PARA CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES (CFT, FT) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (AAox)

Los valores experimentales de **CFT**, **FT** y **AAox** de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB) variaron de 97 a 201 mg de EAG / 100 g de muestra (bs), 54 a 130 mg de EQ / 100 g de muestra (bs) y 5,707 A 14,361  $\mu\text{mol ET}$  / 100 g muestra (bs), respectivamente (**Cuadro 13**). Los resultados del ANOVA mostraron que **CFT**, **FT** y **AAox** fueron significativamente ( $p < 0,001$ ) dependientes de términos lineales y cuadráticos de **tG**. **AAox** sólo fue dependiente de los términos lineales de **TG** ( $p < 0,001$ ). Los modelos de predicción para **CFT**, **FT** y **AAox** fueron:

$$\text{CFT} = 95,41 + 1,08 (\text{tG}) - 3,05\text{E} - 003 (\text{tG})^2$$

$$\text{FT} = 45,54 + 0,887 (\text{tG}) - 2,67\text{E} - 003 (\text{tG})^2$$

$$\text{AAox} = -2133,94 + 272,02 (\text{TG}) + 79,32 (\text{tG}) - 0,1961 (\text{tG})^2$$

Los modelos de regresión explicaron 88%, 87% y 94% de la variabilidad total ( $p < 0,0001$ ) en **CFT**, **FT** y **AAox**, respectivamente (**Cuadro 14**). Para todas las variables de respuesta (**CFT**, **FT** y **AAox**), el análisis de falta de ajuste no fue significativo ( $p > 0,05$ ) y el coeficiente de variación fue  $< 10\%$ . Estos valores indicaron la adecuación y reproducibilidad del modelo. **CFT** y **FT** aumentaron con **tG**, mostrando los valores más altos entre las 125-215 h (**Fig. 1A, 1B**) después de ese tiempo estas variables de respuestas disminuyeron. En general, la **AAox** de las harinas de garbanzo germinado aumentó con **TG** y **tG** hasta alcanzar valores máximos alrededor de 27.5-35 ° C y 125-240 h (**Fig. 1C**).

### B OPTIMIZACIÓN

Al llevar a cabo la superposición de las gráficas de contorno de las variables de respuesta (**Fig. 1A, 1B, 1C**) se obtuvo un gráfico (**Fig 1D**) que muestra la región de optimización correspondiente a la combinación óptima de las variables de

**Cuadro 13.** Diseño experimental<sup>a</sup> utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura de germinación / tiempo de germinación para producir harinas de garbanzo germinado.

Ensayo <sup>b</sup>	Variables de Proceso		Variables Respuesta		
	TG (°C)	tG (h)	CFT <sup>c</sup>	FT <sup>d</sup>	AAox <sup>e</sup>
1	32.8	206.3	178	123	14,361
2	22.2	43.6	149	84	7,110
3	27.5	125	180	107	13,033
4	27.5	125	192	122	12,430
5	32.8	43.6	135	78	10,494
6	27.5	10	97	54	5,707
7	27.5	240	189	93	13,008
8	20	125	167	99	9,157
9	35	125	179	124	13,698
10	27.5	125	201	112	13,016
11	27.5	125	183	107	11,487
12	27.5	125	182	115	12,070
13	22.2	206.3	188	130	12,626

<sup>a</sup> Diseño central compuesto con dos factores y cinco niveles; 13 ensayos .

<sup>b</sup> No corresponden al orden de procesamiento

<sup>c</sup> mg equivalentes de ácido Gálico (EAG) / 100 g muestra (bs)

<sup>d</sup> mg equivalentes de Quercetina (EQ) /100 g muestra (bs)

<sup>e</sup> μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g (BS )

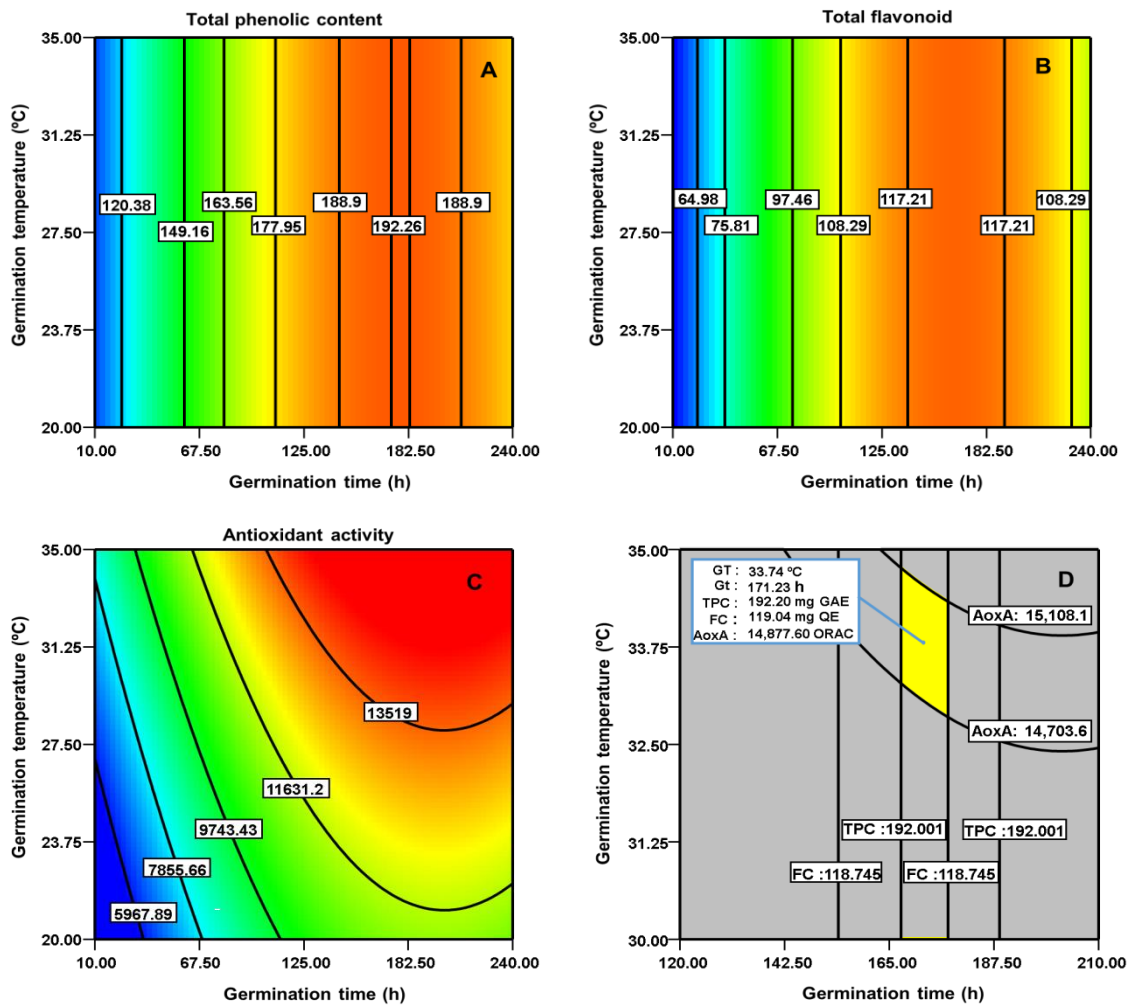
**Cuadro 14.** Coeficientes de regresión y análisis de varianza de modelos de segundo orden, muestran la relación entre las variables de respuesta ( $Y_k$ ) y variables de proceso ( $X$ )

<b>Coeficiente</b>	<b>CFT<sup>a</sup> (<math>Y_{CFT}</math>)</b>	<b>FT<sup>b</sup> (<math>Y_{FT}</math>)</b>	<b>AAox<sup>c</sup> (<math>Y_{AAox}</math>)</b>
Intercepto			
$\beta_0$	183.72***	114.65***	12197.78***
Lineal			
$\beta_1$	NS	NS	1442.62***
$\beta_2$	26.40***	17.77***	2463.52***
Cuadrático			
$\beta_{11}$	NS	NS	NS
$\beta_{22}$	-20.20***	-17.68***	-1296.77***
Interacción			
$\beta_{12}$	NS	NS	NS
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001
R <sup>2</sup>	0.8838	0.8667	0.9449

\* Nivel de Significancia  $P \leq 0.10$  ; \*\* Nivel de Significancia  $P \leq 0.05$  ;

\*\*\* Nivel de Significancia  $P \leq 0.01$  ; NS No Significativo ( $P > 0.10$ ) ;

<sup>a</sup> Contenido de fenólicos totales; <sup>b</sup> Flavonoides totales; <sup>c</sup> Actividad antioxidante.



**Fig 9.** Gráficos de contorno, muestran el efecto del tiempo y temperatura de germinación en (A) **CFT**, (B) **FT**, (C) **AAox**. Región óptima de combinación de variables de proceso (TG= temperatura de germinación, tG= tiempo de germinación) para la producción de HGBO a través del proceso de germinación.



proceso de germinación (TG = 34 ° C / tG = 171h) para obtener valores máximos de **CFT**, **FT** y **AAox**. Los valores predichos para **CFT**, **FT** y **AAox** utilizando las condiciones óptimas de germinación fueron: 192.04 mg EAG / muestra de 100 g (bs), 119.03 mg de EQ / 100 g de muestra (bs) y 14,877  $\mu$ mol de ET / 100 g de muestra (bs), respectivamente (**Fig.1D**). Se produjo HGBO utilizando la combinación óptima de variables del proceso de germinación; los valores experimentales de **CFT**, **FT** y **AAox** de **HGBO** fueron similares a los predichos por los modelos (**Cuadro 15**). Esto indica que las condiciones óptimas utilizadas para la germinación fueron apropiadas y reproducibles.

## **C COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HGBO**

### **1 Composición química**

El **Cuadro 15** muestra la composición química de la **HGIC** y **HGBO**. El proceso de germinación en condiciones óptimas (34°C, 171 h) ocasionó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) (+16.4%) en el contenido de proteína en comparación con HGIC. El-Adawy y col (2002) reportaron un aumento (+8-9%) en el contenido de proteínas después de la germinación de las semillas de garbanzo. Este aumento en el contenido de proteínas puede atribuirse a pérdidas de materia seca, especialmente carbohidratos, debido a la respiración de las semillas durante el proceso de germinación (Mbithi-Mwikya y col, 2000).

Las semillas de garbanzo son ricas en ácidos grasos insaturados Linoleico y Oleico. Esteroles importantes como  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol están presentes en el aceite de garbanzo (Jukantil y col., 2012). La germinación de semillas de garbanzo desi en condiciones optimizadas provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) (-37%) en el contenido de lípidos al compararse con garbanzo desi crudo (**Cuadro 15**). La disminución en el contenido de lípidos se debe, muy probablemente, al uso de lípidos como fuente de energía durante el proceso de germinación. Fouad y Rehab (2015) reportaron que durante la germinación de semillas de lentejas (3-6 días / 25°C en condiciones de oscuridad)

**Cuadro 15.** Composición química, contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante de garbanzo desi crudo y germinado en condiciones óptimas

Componente	Garbanzo pigmentado desi	
	HGIC <sup>c</sup>	HGBO <sup>c</sup>
<b>Composición Química (% bs)</b>		
Proteínas	20.22 ± 0.15 <sup>B</sup>	23.54±0.21 <sup>A</sup>
Lípidos	5.3 ± 0.04 <sup>A</sup>	3.29±0.03 <sup>B</sup>
Fibra dietaria		
Fibra soluble	1.003 ± 0.01 <sup>B</sup>	1.26±0.02 <sup>A</sup>
Fibra Insoluble	28.29 ±0.43 <sup>B</sup>	32.53 ± 0.37 <sup>A</sup>
Fibra total	29.29 ± 0.41 <sup>B</sup>	33.79 ± 0.39 <sup>A</sup>
<b>Compuestos fenólicos</b> [mg Eq de ácido Gálico (EAG)/100 g (bs)]		
Libres	14.07 ± 0.06 <sup>B</sup>	97.43 ± 1.63 <sup>A</sup>
Ligados	96.28 ± 2.01 <sup>B</sup>	120.21 ± 1.77 <sup>A</sup>
Totales	110.17 ± 1.59 <sup>B</sup>	217.22 ± 2.07 <sup>A</sup>
<b>Flavonoides</b> [mg equival de Quercetina (EQ)/100 g (bs)]		
Libres	18.49±0.09 <sup>B</sup>	30.05±0.09 <sup>A</sup>
Ligados	40.35±1.11 <sup>B</sup>	92.55±1.27 <sup>A</sup>
Totales	58.77±0.83 <sup>B</sup>	122.63±1.44 <sup>A</sup>
<b>Saponinas</b>	385.6±15.9 <sup>B</sup>	519.09±22.9 <sup>A</sup>
<b>Taninos</b>	346.2±24.2 <sup>A</sup>	249.3±18.7 <sup>B</sup>
<b>Actividad antioxidante</b> [μmol equivalentes Trolox (ET)/100 g (bs)]		
ORAC		
Fitoquímicos libres	2,329±119 <sup>B</sup>	8,266±210 <sup>A</sup>
Fitoquímicos ligados	3,127±123 <sup>B</sup>	6,876±187 <sup>A</sup>
Fitoquímicos totales	5,456±179 <sup>B</sup>	15,143±225 <sup>A</sup>
ABTS		
Fitoquímicos libres	2,783±133 <sup>B</sup>	7,854±197 <sup>A</sup>
Fitoquímicos ligados	3,088±121 <sup>B</sup>	6,582±174 <sup>A</sup>
Fitoquímicos totales	5,871±221 <sup>B</sup>	14,435±230 <sup>A</sup>

<sup>a</sup> Datos están expresados como media± desviación standar;

<sup>b</sup> Medias con diferente letra (A-B) en la misma fila son significativamente diferentes (Duncan, p ≤0.05);

<sup>c</sup> HGIC=Harina de garbanzo integral cruda, HGBO=Harina de garbanzo bioprocesado optimizada

el contenido de lípidos mostró una disminución en comparación con las semillas crudas.

El contenido de fibra dietaria de las semillas de garbanzo aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con el proceso de germinación, la fibra dietaria total incrementó (+ 15%), la fracción soluble (+ 26%) y la fracción insoluble (+ 15%). De acuerdo con Martín-Cabrejas y col. (2003), la germinación de chicharos llevada a cabo en condiciones (20°C / 2-6 días / fotoperiodo) aumentó significativamente el contenido de fibra dietaria total, y de las fracciones soluble e insoluble, comparado con la muestra sin procesar. El proceso de germinación puede modificar la estructura de la pared celular de las semillas, al romperse la interacción carbohidrato-proteína, se afecta la integridad de los tejidos de la pared celular, produciendo un incremento de celulosa, hemicelulosa y un incremento de polisacáridos pécticos. Megat y col (2016) reportaron que el contenido de fibra dietaria soluble, insoluble y total de leguminosas germinadas (frijol, frijol mungo, soya, cacahuate) incrementó después del proceso de germinación. La fibra dietaria está asociada con la prevención de diferentes enfermedades, y es fundamental en la salud intestinal (Phillips, 2013). La germinación podría ser utilizada como una herramienta para aumentar el contenido de fibra en las semillas, mejorando sus beneficios para la salud.

## **D CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HGBO**

### **1 Taninos**

La germinación de semillas de garbanzo desi, en condiciones optimizadas, causó una disminución [-13.5 % / de 346.2 a 249.3 mg/100 g de muestra (bs)] en el contenido de taninos; este decremento puede estar relacionado con la lixiviación de compuestos diversos que se produce durante el periodo de remojo previo al proceso de germinación.

Prakash y col (2007) reportaron una disminución de (-16%) en el contenido de taninos en semillas de garbanzo germinado al comparar con garbanzo crudo.

Fouad y Rehab (2015) estudiaron el efecto de la germinación en el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de lenteja, encontrando una disminución en el contenido de taninos (-59%) comparado con la muestra sin procesar.

## 2 Saponinas

El bioproceso de germinación, llevado a cabo en condiciones optimizadas, incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de saponinas (+34%) comparado con la muestra sin procesar. El contenido de saponinas en HGIC fue de 385.6 mg/100 g muestra (bs), mientras que el contenido de saponinas en HGBO 519.09 mg/100 g muestra (bs) (**Cuadro 15**).

Investigaciones previas (Paucar-Menacho y col, 2010) han reportado que la optimización del bioproceso de germinación de semillas de soya permitió incrementar el contenido de compuestos bioactivos, entre ellos las saponinas; la germinación de semillas de soya en condiciones optimas (63 h/30°C) incrementó el contenido de saponinas (+32%).

Investigaciones previas reportan el efecto antitumoral que tienen las saponinas sobre diferentes líneas celulares de cáncer, mediante el arresto del ciclo celular y la inducción de apoptosis (Chen, 2003; Man y col 2010)

## 3 Compuestos fenólicos totales

Como se muestra en la **Cuadro 15**, la germinación también incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de compuestos fenólicos totales en semillas de garbanzo desi; los compuestos fenólicos libres, ligados y totales se incrementaron en +593%, +25% y + 97%, respectivamente, en relación con las semillas crudas. El proceso de germinación mejora la calidad fitoquímica y nutricional de leguminosas germinadas debido principalmente a cambios en la composición de compuestos fenólicos y de fibra dietaria, mejorando y maximizando las propiedades benéficas de las leguminosas (Dueñas y col., 2016). Nuestros resultados indicaron que la germinación es un bioproceso eficiente para

mejorar la concentración de compuestos fenólicos en semillas de garbanzo. Esto podría atribuirse a la biosíntesis y liberación de compuestos fenólicos. Durante la germinación de semillas, la enzima fenilalanina amonio liasa es altamente activa y podría promover el proceso de biosíntesis de compuestos fenólicos (Duodu, 2014). Además, el sistema respiratorio está activo durante la germinación y podría producir diferentes enzimas tales como las enzimas proteolíticas, amilolíticas y de degradación de las paredes celulares que contribuyen a la liberación de compuestos fenólicos unidos (Acosta-Estrada y col, 2014).

#### **4 Contenido de flavonoides totales**

Después de germinar a 34°C durante 171 h las semillas de garbanzo desmostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de flavonoides libres (+ 67%), ligados (+ 131%) y totales (+ 111%) en comparación con el material no procesado (**Cuadro 15**).

Wu y col (2012) reportaron que la germinación a 25°C durante cuatro días de semillas de garbanzo, incrementó 90 veces el contenido de flavonoides, en comparación con semillas de garbanzo crudo. Los beneficios para la salud de la semilla de garbanzo han recibido muy poca atención. Sin embargo, los estudios de laboratorio, las investigaciones epidemiológicas y los ensayos clínicos en humanos indican que los flavonoides tienen importantes actividades biológicas, como quimiopreventivos y quimioterapéuticos. Según Ren y col (2003) los flavonoides pueden ser agentes anticancerígenos prometedores, ejerciendo diferentes mecanismos de acción. Pueden poseer actividades antioxidantes, antiproliferativas, anticancerígenas, antiangiogénicas y pueden también regular la apoptosis y el ciclo celular.

#### **5 Perfil de los ácidos fenólicos**

El **Cuadro 16** presenta el análisis cromatográfico de ácidos fenólicos en extractos etanólicos de semillas de garbanzo. Se identificaron un total de diez ácidos fenólicos: cuatro hidroxicinámicos (Cafeico, Cumárico, Ferúlico, Sinápico) y

**Cuadro 16.** Efecto de la germinación en contenido de ácidos fenólicos en harinas de garbanzo desi

	HGIC <sup>b</sup>			HGBO <sup>c</sup>		
	Libre	Ligado	Total	Libre	Ligado	Total
<b>Ácidos Fenólicos <sup>a</sup></b>						
<b>Hidroxicinámicos</b>						
Cafeico	0.20	0.90	1.10 <sup>B</sup>	2.80	0.01	2.81 <sup>A</sup>
Cumárico	0.20	0.90	1.10 <sup>B</sup>	3.20	8.60	11.80 <sup>A</sup>
Ferúlico	0.20	2.00	2.20 <sup>B</sup>	3.90	7.70	11.60 <sup>A</sup>
Sinápico	0.10	1.10	1.20 <sup>B</sup>	3.70	0.10	3.80 <sup>A</sup>
<b>Hidroxibenzoicos</b>						
Elágico	0.90	3.40	4.30 <sup>B</sup>	100.3	1.00	101.30 <sup>A</sup>
Gálico	13.9	32.70	46.6 <sup>A</sup>	23.40	14.00	37.40 <sup>B</sup>
ρ-Hidroxibenzoico	0.30	0.50	0.80 <sup>B</sup>	0.40	0.50	0.90 <sup>A</sup>
Protocatecuico	2.40	2.70	5.10 <sup>B</sup>	12.10	1.10	13.20 <sup>A</sup>
Siríngico	2.90	3.40	6.30 <sup>B</sup>	11.30	9.70	21.00 <sup>A</sup>
Vanílico	2.90	0.50	3.40 <sup>B</sup>	6.10	1.70	7.80 <sup>A</sup>

<sup>a</sup>μg/g de muestra (bs), <sup>b</sup>HGIC= harina de garbanzo integral cruda, <sup>c</sup>HGBO= harina de garbanzo bioprocesada optimizada; <sup>A-B</sup> Medias con diferente letra (A-B) en la misma línea son significativamente diferentes (Duncan, p ≤0.05)

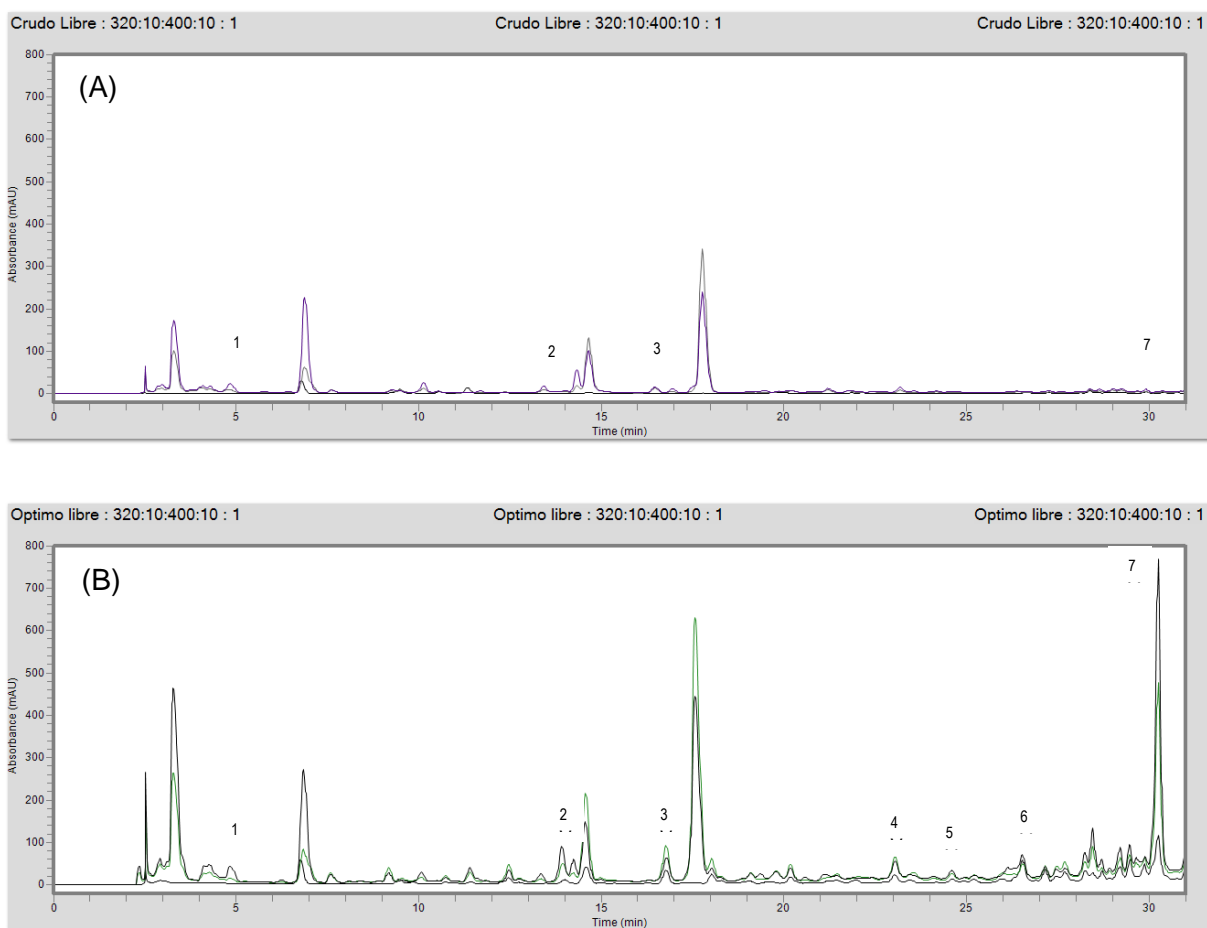
seis hidroxibenzoicos (Gálico, Elágico, Hidroxibenzoico, Protocatecuico, Siríngico, Vanílico). Los análisis cromatográficos revelaron que la germinación en condiciones optimizadas causó un incremento en el contenido de ácidos Sinápico (+217%), Siríngico (+233%), Ferúlico (+427%), Cumárico (+972%) y Elágico (+2,256%) en comparación con niveles de ácidos fenólicos presentes en garbanzo integral crudo (**Fig 10**). Los ácidos fenólicos simples han demostrado mejorar los niveles plasmáticos de glucosa y lípidos en enfermedades tales como obesidad y diabetes mellitus aumentando la absorción de glucosa y regulando la síntesis de glucógeno (Vinayagam y col, 2015). El ácido elágico está vinculado con efectos benéficos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas, anti-carcinogénesis y anti-mutagénesis (Sepúlveda y col, 2011).

Khang y col, (2016) detectaron y cuantificaron 13 compuestos fenólicos diferentes en seis leguminosas de grano germinadas, entre ellos los ácidos Sinápico, Ferúlico, Elágico y Cinámico mostraron correlación significativa con la actividad antioxidante.

Las semillas pigmentadas de garbanzo desi son una fuente importante de compuestos fenólicos que podrían prevenir enfermedades y mejorar la salud humana.

## **6 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de garbanzo aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) después de germinar las semillas utilizando condiciones óptimas ( $34^{\circ}\text{C}/ 171 \text{ h}$ ). El incremento en AAox, evaluado mediante el ensayo de ORAC, fue: de + 255 %, +120 % y +178% para fitoquímicos libres, ligados y totales, respectivamente, al compararse con los contenidos en semilla cruda (HGIC). Al evaluar la AAox utilizando el método ABTS, se observaron tendencias similares a las encontradas al aplicar ORAC (**Cuadro 15**). La presente investigación reveló que los fitoquímicos ligados, generalmente no reportados en otras investigaciones, contribuyen significativamente a la AAox total. Otros investigadores (Wu y col



**Fig 10.** Cromatogramas de perfil de ácidos fenólicos de extractos de HGIC (A) y de HGBO (B). (1) Acido gálico, (2) ácido vanílico, (3) ácido siríngico, (4) ácido ferúlico, (5) ácido sinápico, (6) ácido protocatecuico, (7) ácido elágico.



2012, Gharachrorloo y col, 2013) también encontraron que el bioproceso de germinación incrementa la actividad antioxidante de las leguminosas, en comparación con las muestras crudas. Sin embargo, no determinaron la actividad antioxidante de los fitoquímicos presentes en los extractos ligados.

Durante la germinación se producen cambios metabólicos importantes, uno de ellos es el aumento de la AAox, debido principalmente al incremento en el contenido de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos totales (CFT), por la acción de las enzimas hidrolíticas endógenas. Por lo tanto, el aumento en el contenido de compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante de las semillas de garbanzo durante la germinación contribuyen de manera significativa a la mejora de las propiedades nutraceuticas de las semillas (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2010). Yu-Wei y Wang (2015) reportaron una correlación significativa entre CFT y la actividad antioxidante en las semillas germinadas. Xue y col, (2016) realizaron un estudio sobre compuestos bioactivos y actividad antioxidante de tres tipos de leguminosas durante el proceso de germinación; concluyeron que la contribución relativa de los CFT y flavonoides totales (FT) sobre el aumento de la actividad antioxidante fue de (44.8 – 90.3 %). Nuestros resultados indican que AAox tiene una fuerte correlación con CFT ( $r = 0.835$ ,  $p < 0.005$ ) y FT ( $r = 0.822$ ,  $p < 0.007$ ). Además, proporciona información importante sobre la calidad nutraceutica de las semillas germinadas de garbanzo.

## **E ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR (AAox<sub>celular</sub>)**

Los resultados de la actividad antioxidante a nivel celular de los extractos libres y ligados de las harinas crudas y bioprocesadas, se obtuvieron a través de dos protocolos (con y sin lavado con PBS). Una vez que las células Hep G2 estuvieron en contacto con los extractos, se eliminó de la placa de 96 pozos el extracto con los fitoquímicos antioxidantes y antes de generar la producción de radicales libres mediante la degradación térmica del generador AAPH se llevó a cabo un lavado con PBS estéril a cada uno de los pozos.

## 1 Protocolo con lavado de pbs

Con respecto al protocolo donde se lavan los pozos de la microplaca con PBS, el extracto con mejor actividad antioxidante y concentración efectiva media ( $AAox_{celular}=222.2 \mu\text{M EQ}/100 \text{ g de muestra}$  /  $EC_{50}= 5.19 \text{ mg/mL}$  y) fue el obtenido de la fracción libre de la **HGBO**; la fracción libre del extracto de garbanzo sin procesar (**HGIC**) procesar **HGIC** presentó  $AAox_{celular} = 41.21 \mu\text{M EQ}/100 \text{ g de muestra}$  y  $EC_{50}=28 \text{ mg/mL}$  (**Cuadro 17**). El proceso de germinación incrementó significativamente ( $p<0.05$ ) la  $AAox_{celular}$  de fitoquímicos presentes en la fracción libre alrededor de cinco veces; esto representa un incremento del 400% con respecto a material crudo (**Cuadro 17**).

En cuanto a la fracción ligada, el extracto de **HGIC** tuvo  $AAox_{celular} = 217.18 \mu\text{M EQ}/100 \text{ g de muestra}$  y  $EC_{50}= 5.35 \text{ mg/ml}$  mientras que para el extracto de **HGBO** los valores fueron de  $AAox_{celular} = 78.10 \mu\text{M EQ}/100 \text{ g de muestra}$  y  $EC_{50} = 14.92 \text{ mg/mL}$  (**Cuadro 17**). El bioproceso de germinación en condiciones optimizadas disminuyó significativamente ( $p<0.05$ ) la  $AAox_{celular}$  de fitoquímicos presentes en la fracción ligada en alrededor del 64 % con respecto a material crudo (**Cuadro 17**).

Diferentes investigadores han reportado una disminución de compuestos fenólicos ligados y un correspondiente incremento en la fracción de compuestos fenólicos libres. Esto puede deberse a que durante el bioproceso se activa el sistema de respiración y produce diferentes tipos de enzimas intrínsecas como amilolíticas, proteolíticas y de degradación de la pared celular como esterasas (Acosta Estrada y col, 2014), que contribuye a la liberación de compuestos bioactivos relacionados con la actividad antioxidante y al aumento de los mismos en la fracción soluble o libre, como consecuencia se observa la disminución de los compuestos bioactivos en la fracción ligada o insoluble.

## 2 Protocolo sin lavado con PBS

**Cuadro 17.** Actividad antioxidante celular y concentración efectiva media de extractos de harinas de garbanzo desi, crudo y bioprocesado (con lavado PBS)

<b>Extractos</b>	<b>Con lavado PBS</b>		
<b>Harina de garbanzo integral crudo</b>	<b>EC50</b>	<b>**AAox<sub>celular</sub></b>	<b>***Calidad AAox<sub>celular</sub></b>
Fitoquímicos libres	28 ±4.4 <sup>a</sup>	41.21±6.0 <sup>c</sup>	50.07±7.3 <sup>a</sup>
Fitoquímicos ligados	5.35±0.62 <sup>c</sup>	217.18±21 <sup>a</sup>	38.49±4.3 <sup>b</sup>
Fitoquímicos totales		258.39±27	88.56±5.8
<b>Harina de garbanzo bioprocesado optimizada</b>			
Fitoquímicos libres	5.19±0.12 <sup>c</sup>	222.2±5.6 <sup>a</sup>	38.97±1 <sup>ab</sup>
Fitoquímicos ligados	14.92±1.9 <sup>b</sup>	78.10±10 <sup>b</sup>	11.07±1.4 <sup>c</sup>
Fitoquímicos totales		300.3±16	50.04±1.2

\* Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (Duncan p<0.05)

\*\* μmol EQ/100g muestra (bs)

\*\*\* μmol EQ/100 μm Fenólicos totales

En cuanto al protocolo sin lavado con PBS estéril los resultados son similares a los obtenidos en el protocolo con lavado, es decir el bioproceso de germinación incrementó la **AAox**<sub>celular</sub> de la fracción libre de la **HGBO** cinco veces, lo que representa un aumento del 470 % aproximadamente, los valores de **AAox**<sub>celular</sub> para extractos de fitoquímicos libres de **HGIC** y **HGBO** fueron de 137.2  $\mu\text{M}$  EQ/100 g de muestra y de 788.2  $\mu\text{M}$  EQ/100 g de muestra, respectivamente (**Cuadro 18**). La concentración efectiva media (**EC**<sub>50</sub>) para extractos de fitoquímicos libres de **HGIC** y **HGBO** fue de 4.91 mg/mL y 0.88 mg/mL, respectivamente (**Cuadro 18**). Por otra parte el bioproceso de germinación en condiciones optimizadas disminuyó la **AAox**<sub>celular</sub> de la fracción ligada en un 73%; la **AAox**<sub>celular</sub> para extractos de fitoquímicos ligados de **HGIC** y **HGBO** fue de 387.8  $\mu\text{M}$  EQ/100 g de muestra y de 102.04  $\mu\text{M}$  EQ/100 g de muestra, respectivamente (**Cuadro 18**).

Los valores de **EC**<sub>50</sub> y de **AAox**<sub>celular</sub> presentaron mejores resultados en el protocolo sin lavado de PBS. Al utilizar dos protocolos para cuantificar la actividad antioxidante en una muestra se obtienen diferencias significativas, las cuales dependen del grado de absorción y asociación a la membrana celular que presentan los fitoquímicos presentes en el extracto. Cuando no se lleva a cabo el lavado con PBS, el resultado en la actividad antioxidante es mayor, al igual que los coeficientes de variación, debido a la interacción de la muestra y los oxidantes con otros factores en el medio residual. Cuando se lava con PBS se remueven la mayoría de los componentes del medio que causan interferencia, y únicamente los compuestos que lograron entrar a la célula o bien los que están fuertemente ligados a la membrana celular son lo que proveen la actividad antioxidante (Wolfe y Liu 2007).

Los compuestos antioxidantes, tienen dos oportunidades para ejercer la actividad antioxidante. Los fitoquímicos pueden actuar a nivel de la membrana celular y romper la reacción en cadena de los radicales libres a nivel de la superficie celular, o bien, pueden atravesar la membrana y reaccionar con los ROS intracelulares. La eficacia de la absorción celular o la unión a la membrana

**Cuadro 18.** Actividad antioxidante celular y concentración efectiva media de extractos de harinas de garbanzo desi, crudo y bioprocesado (sin lavado PBS)

<b>Extractos</b>	<b>Sin lavado PBS</b>		
	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>**AAox<sub>celular</sub></b>	<b>***AAox<sub>celular</sub></b>
<b>Harina de garbanzo integral crudo</b>			
Fitoquímicos libres	4.91±0.73 <sup>B</sup>	137.2±18 <sup>C</sup>	166.00±12.9 <sup>A</sup>
Fitoquímicos ligados	1.72± 0.10 <sup>C</sup>	387.9±23.8 <sup>B</sup>	68.74±4.2 <sup>C</sup>
Fitoquímicos totales		525.1±41.8	234.74±8.5
<b>Harina de garbanzo bioprocesado optimizada</b>			
Fitoquímicos libres	0.88±0.13 <sup>C</sup>	788.3 ±77.8 <sup>A</sup>	138.20±13.6 <sup>B</sup>
Fitoquímicos ligados	6.53±0.30 <sup>A</sup>	102.04±4.6 <sup>C</sup>	14.47±0.7 <sup>D</sup>
Fitoquímicos totales		890.34±82.4	152.67±7.5

\*Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (Duncan p<0.05)

\*\* μmol EQ/100g muestra (bs)

\*\*\* μmol EQ/100 μm Fenólicos totales

combinada con su capacidad para secuestrar radicales libres dicta la eficacia de los fitoquímicos de la muestra

Las propiedades físicas de los flavonoides determinan su interacción con la membrana celular. Los flavonoides hidrofóbicos pueden ser embebidos profundamente en la membrana y pueden afectar la fluidez de la misma y romper las reacciones oxidativa en cadena. Los compuestos mas polares interactúan con la superficie de la membrana a traves de puentes de hidrogeno protegiéndola del estrés oxidativo intra y extracelular. La hidrofobicidad de los compuestos es importante pero no es un factor que determine su efectividad se debe estudiar la relación estructura-funcion de los fitoquímicos (Wolfe y Liu, 2007)

Otra manera de reportar la **AAox<sub>celular</sub>** es mediante la actividad antioxidante de los extractos o alimentos con respecto a 100  $\mu\text{mol}$  de compuestos fenólicos totales (**CFT**), también llamada calidad antioxidante. La **AAox<sub>celular</sub>** de los extractos de HGIC y HGBO, expresada en función de los compuestos fenólicos, se muestra en el **Cuadro 17**. La **AAox<sub>celular</sub>** es expresada como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Quercetina/ 100  $\mu\text{mol}$  de compuestos fenólicos totales (**CFT**). (Wolfe y Liu, 2007; Song y col, 2010)

En el protocolo con lavado de PBS, la **AAox<sub>celular</sub>** total (suma de **AAox<sub>celular</sub>** de extractos de fitoquímicos libres y ligados) para extractos de **HGIC** y de **HGBO** fue de 88.5 y 50.05  $\mu\text{mol EQ}/100 \mu\text{mol}$  de compuestos fenólicos totales (**CFT**), respectivamente, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambas actividades (**Cuadro 17**). En el protocolo sin lavado de PBS, la **AAox<sub>celular</sub>** total (suma de **AAox<sub>celular</sub>** de extractos de fitoquímicos libres y ligados) para extractos de **HGIC** y de **HGBO** fue de 234.74 y 152.67  $\mu\text{mol EQ}/100 \mu\text{mol}$  **CFT**, respectivamente (**Cuadro 18**). El valor de **AAox<sub>celular</sub>** con respecto a 100  $\mu\text{mol}$  de compuestos fenólicos totales, no es proporcional al contenido de **CFT**; los valores de **AAox<sub>celular</sub>** son más bajos en los extractos de la **HGBO**.

Previamente se ha reportado la **AAox<sub>celular</sub>** de diversos frutos y vegetales, siguiendo los protocolos con y sin lavado con PBS; la espinaca presentó un contenido alto de compuestos fenólicos totales (151 mg EAG/100 g muestra) y una

**AAox**<sub>celular</sub> de 1.13  $\mu\text{mol EQ}/100 \mu\text{mol CFT}$ , mientras que la col contiene menor concentración de CFT (44.6  $\mu\text{molEQ}/100 \text{ g}$ ) y una **AAox**<sub>celular</sub> de 7.44  $\mu\text{molEQ}/100\mu\text{mol CFT}$  (Song y col, 2010)

La **AAox**<sub>celular</sub> ha sido poco estudiada en alimentos procesados o bioprocesados. Xu y Chang (2012) reportaron que la **AAox**<sub>celular</sub>, evaluada acorde a protocolo de lavado con PBS, expresada como concentración efectiva media de extractos de leguminosas sin procesar (chicharo, garbanzo, frijol y soya) oscila entre 0.6 a 1.6 mg/mL. Sin embargo en el caso del garbanzo este no se reporta como **EC**<sub>50</sub>, ya que la inhibición no es dependiente de la dosis.

Investigaciones efectuadas por Wolfe y Liu (2007) a una amplia gama de vegetales sin procesar, siguiendo el mismo protocolo de lavado con PBS, la **EC**<sub>50</sub> es mayor (10.8 a 53 mg/mL) que la reportada para leguminosas, es decir, las leguminosas presentan un mayor potencial antioxidante, comparado con el de los vegetales. Nuestros resultados, obtenidos acorde al protocolo de lavado con PBS, presentan un valor de **EC**<sub>50</sub> de 5.35 a 28 y de 5.1 a 14.9 mg/mL para extractos provenientes de **HGIC** y **HGBO**, respectivamente (**Cuadros 17, 18**). Las diferencias de los resultados de la presente investigación, con respecto a investigaciones previas, podrían deberse a factores como la extracción de compuestos bioactivos, el tipo de línea celular utilizada y el tipo de leguminosa.

## **F ACTIVIDAD ANTICARCINOGENICA**

### **1 Daño morfológico en células de cáncer de mama**

Para determinar el tiempo en los que se pondrían en exposición las células de cáncer de mama con los extractos libres de **HGIC** y **HGBO**, y evidenciar daño morfológico, se llevó a cabo un análisis de microscopía con células teñidas con marcadores fluorescentes específicos para observar el núcleo y los filamentos de actina del citoesqueleto. Las tinciones se realizaron después de exponer las células a los extractos por 6,12 y 24 h, demostrando que tiempos largos de exposición causaban la destrucción total de las células, es por ello que se fijó un tiempo de exposición de seis horas para todos los experimentos posteriores.

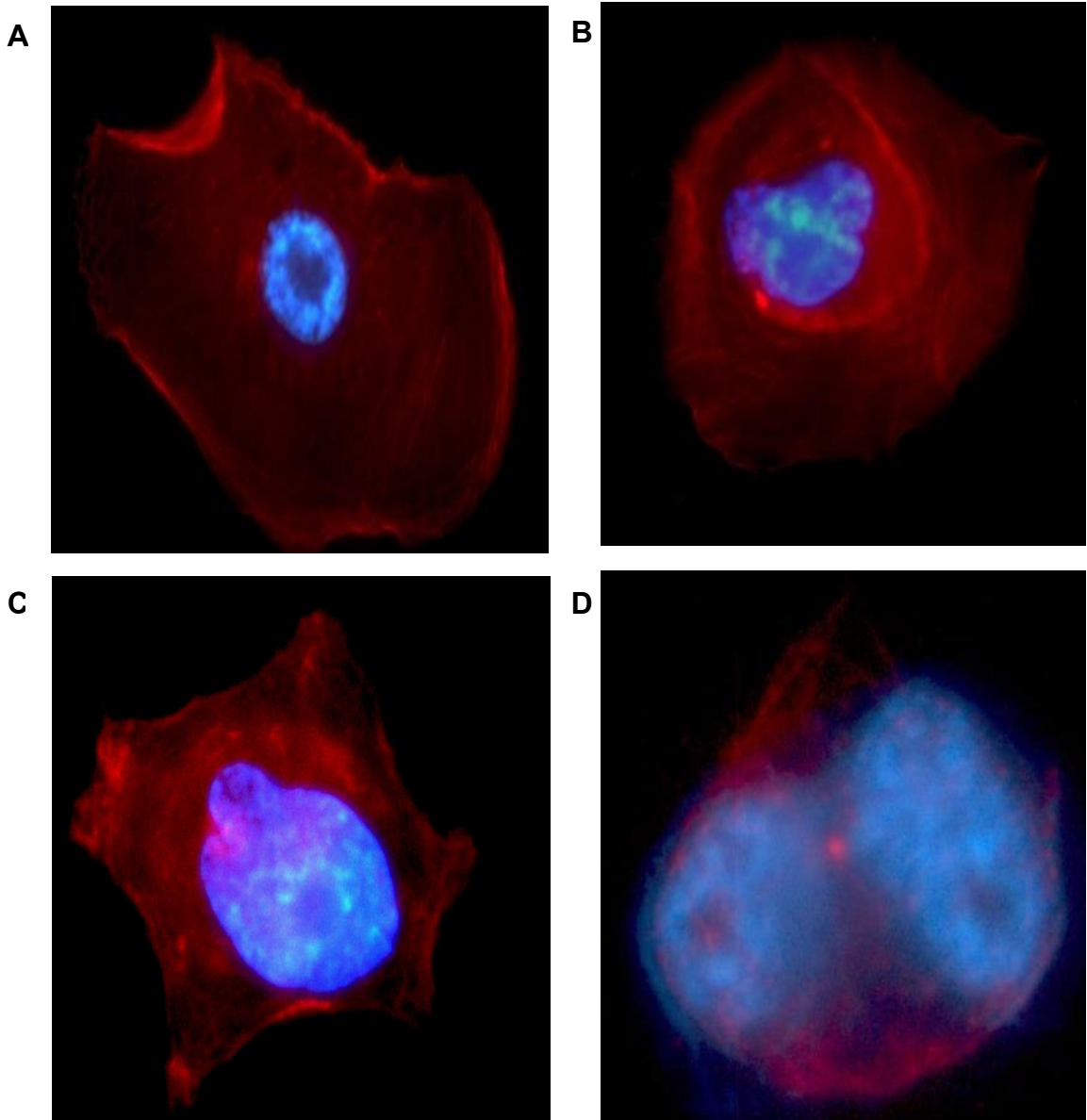
En la **Fig 11A** se muestra la célula de cáncer de mama MDAMB231 sin tratamiento, es decir sin haberla puesto en contacto con los extractos, se observa claramente la integridad de la membrana plasmática y los filamentos de actina en color rojo, así como un núcleo definido teñido de azul en el centro de la célula. La **Fig 11B** corresponde a la célula tratada con cisplatino 40  $\mu\text{m}$ , antineoplásico utilizado como tratamiento coadyuvante en quimioterapias, el cisplatino redujo el tamaño de la célula redondeandola, y provocó fragmentación nuclear. El efecto de los extractos de **HGIC** y **HGBO** a una concentración de 10 mg/ml se observan en **Fig 11C** y **Fig11D**, respectivamente. Los compuestos bioactivos presentes en los extractos de **HGIC** provocaron la contracción de la membrana plasmática y daño en la membrana nuclear. Por otra parte, los compuestos bioactivos de los extractos de **HGBO** afectaron de manera importante ambas membranas, observándose claramente un núcleo fragmentado y poco delimitado por su membrana, así mismo se observa que la célula disminuyó su tamaño y sufrió un redondeamiento con respecto a la estructura original.

La morfología celular característica de las células sometidas a apoptosis incluyen cambios en la membrana celular tales como pérdida de la asimetría y fijación de membrana, fragmentación nuclear, condensación de cromatina y fragmentación cromosómica del ADN (Hengartner, 2000). Estos resultados sugieren que los tratamientos de garbanzo tanto crudo como germinado fueron citotóxicos para las células, pero no determinan si promueven la muerte celular programada o apoptosis, para ello se hicieron los siguientes ensayos celulares.

## **2 Inhibición de proliferación de células de cáncer de mama**

Con el propósito de determinar si los extractos de **HGIC** y **HGBO** ocasionaban la inhibición de la proliferación celular en la línea MDAMB 231 se utilizó un kit de MTT, el cual está diseñado para medir el porcentaje de citotoxicidad que sufren las células cuando son expuestas a un agente citotóxico, mediante la cuantificación de la actividad enzimática mitocondrial de las células viables.





**Fig 11.** Cambios morfológicos en línea celular MDAMB231, tratada con extractos de **HGIC** y **HGBO**. **(A)**: Célula sin tratamiento (control negativo), **(B)**: célula con cisplatino 40µm (control positivo), **(C)**: Célula tratada con extractos de **HGIC**, **(D)**: Célula tratada con extractos de **HGBO**.

Se evaluó el efecto del extracto libre de **HGIC** y **HGBO** en seis concentraciones (0.3, 0.5, 1, 5, 10 y 15 mg/ml). Cada ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes. La exposición al extracto fue de seis horas. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de garbanzo evaluados, disminuyeron la viabilidad de las células de cáncer de mama, con respecto al control utilizado (células MDAMB 231 sin tratamiento).

Sin embargo, el extracto de la **HGBO** mostró una menor viabilidad (46-90%) con respecto al extracto de **HGIC** (72-97%), esto quiere decir, que el potencial de inhibición de la proliferación de células de cáncer es mayor en el extracto de **HGBO**. Esto podría deberse a que durante el proceso de germinación se mejoran los contenidos de compuestos bioactivos presentes en la semilla cruda, como agliconas de saponinas y flavonoides (Guajardo Flores y col, 2012). Además, la germinación de semillas de garbanzo desi en condiciones optimizadas incrementó el contenido de fitoquímicos con respecto a la **HGIC**, como compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y mejoró el perfil de ácidos fenólicos principalmente de ácido Elágico, el cual ha sido asociado con beneficios a la salud, por su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimutagénica y antiproliferativa (Sepulveda y col 2011).

No se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento o proliferación de células de cáncer de mama cuando se expusieron a concentraciones bajas del extracto de **HGIC** de 0.3 a 5 mg/mL). La inhibición fue significativamente mayor cuando se trataron con concentraciones altas de extracto (10 a 15 mg/mL), la actividad antiproliferativa de este extracto es dependiente de la dosis, a mayor dosis mayor inhibición de la proliferación.

En cuanto al extracto de **HGBO**, la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) a medida que se fue aumentando la dosis, actuando como inhibidor de proliferación dependiente de la dosis (**Cuadro 19a, Fig 12**).

**Cuadro 19a** Efecto de los extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre la viabilidad de células de cáncer de mama MDAMB231

% de Viabilidad		
Tratamiento (mg/mL)	HGIC	HGBO
0	100	100
0.3	94.6±1.2 <sup>A</sup>	90.5±2.7 <sup>A</sup>
0.5	92.9±2.02 <sup>A</sup>	83.4±5.5 <sup>AB</sup>
1	97.2±2.3 <sup>A</sup>	82.3±1.4 <sup>B</sup>
5	96.4±1.3 <sup>A</sup>	58.9±2.1 <sup>C</sup>
10	79.2±1.3 <sup>B</sup>	51.9±1.8 <sup>CD</sup>
15	72.0±1.01 <sup>C</sup>	46.6±1.09 <sup>D</sup>

<sup>a</sup> Línea celular MDAMB231;

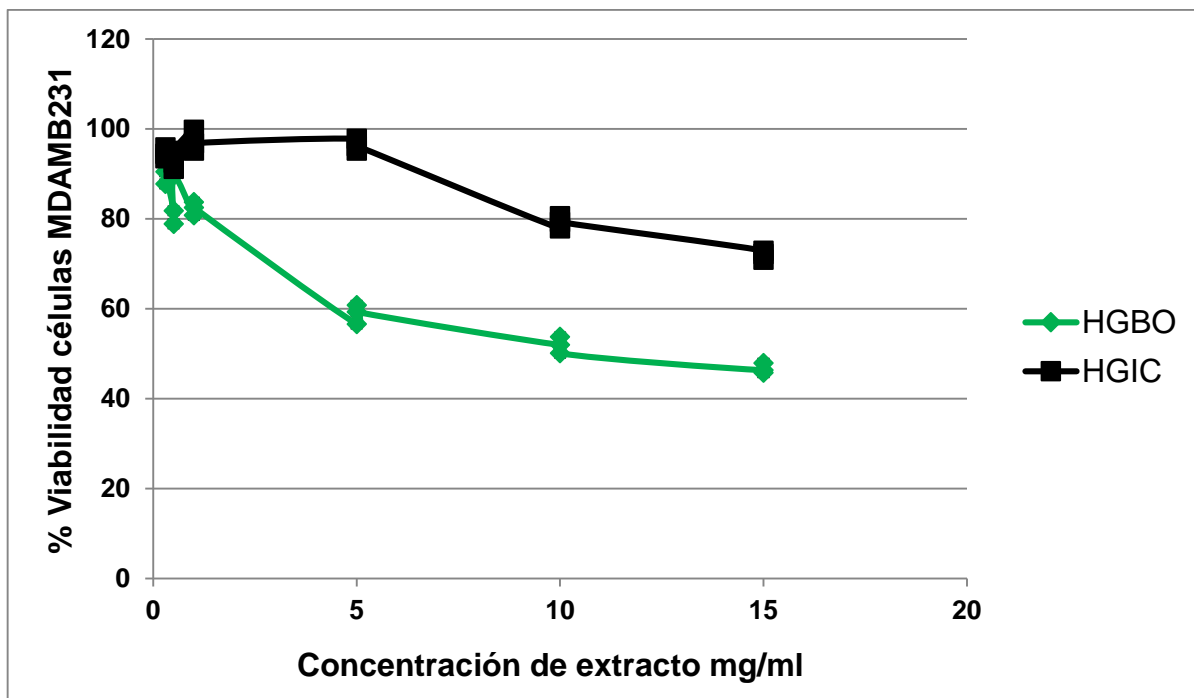
Letras diferentes en columnas indican que existe diferencias significativas (Duncan p<0.05)

**Cuadro 19b** Efecto de los extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre la viabilidad de células NIH3T3

% de Viabilidad		
Tratamiento (mg/mL)	HGIC	HGBO
0	100	100
0.3	101.6±2.4 <sup>A</sup>	97.7±1.8 <sup>A</sup>
0.5	92.2±0.7 <sup>B</sup>	91.2±4.7 <sup>A</sup>
1	86.1±2.4 <sup>B</sup>	87.1±1.9 <sup>A</sup>
5	71.1±5.8 <sup>B</sup>	87.3±2.9 <sup>B</sup>
10	62.0±6.2 <sup>C</sup>	56.7±5.5 <sup>C</sup>
15	56.3±4.8 <sup>C</sup>	49.9±4.8 <sup>C</sup>

<sup>b</sup> Línea celular NIH3T3.

Letras diferentes en columnas indican que existe diferencias significativas (Duncan p<0.05)



**Fig 12.** Efecto de diferentes concentraciones de extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre la viabilidad de células de cáncer de mama MDAMB 231

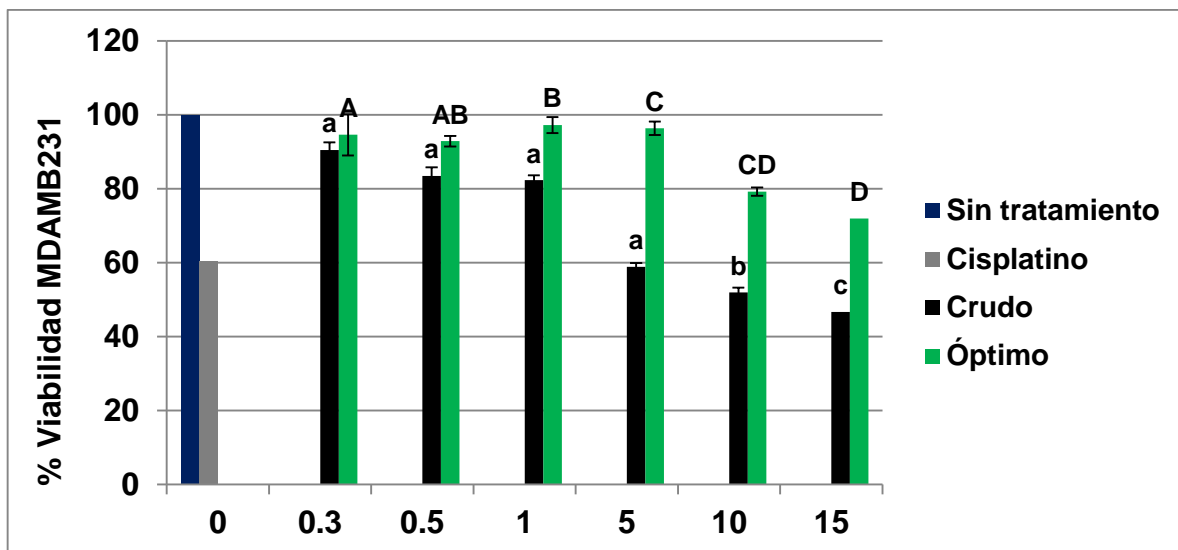
Se utilizaron controles positivos y negativos para comprobar la funcionalidad las células de cáncer de mama, es decir un fármaco antineoplásico (cisplatino 40µm) como control positivo y la misma línea MDAMB 231 sin ningún tratamiento, como control negativo. Los resultados mostraron que la célula sin tratamiento presentó una viabilidad del 100%, y cisplatino de 60%, el fármaco utilizado inhibió el crecimiento de células de cáncer un 40%, mientras que el extracto de HGBO inhibió hasta un 53% a la misma línea celular (**Fig 13**)

Con la finalidad de analizar el efecto de los extractos hacia células no transformadas, se utilizó la línea celular NIH3T3 (fibroblasto de embrión de ratón) para estudiar la especificidad del extracto hacia la proliferación de células de cáncer. Los resultados nos indicaron que la línea celular NIH3T3, si fue afectada por la exposición a los extractos de garbanzo, aunque no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los extractos crudos y germinados. El porcentaje de inhibición fue de 0-43% para **HGIC** y de 2-53% para **HGBO** (**Cuadro 19b, Fig 14**).

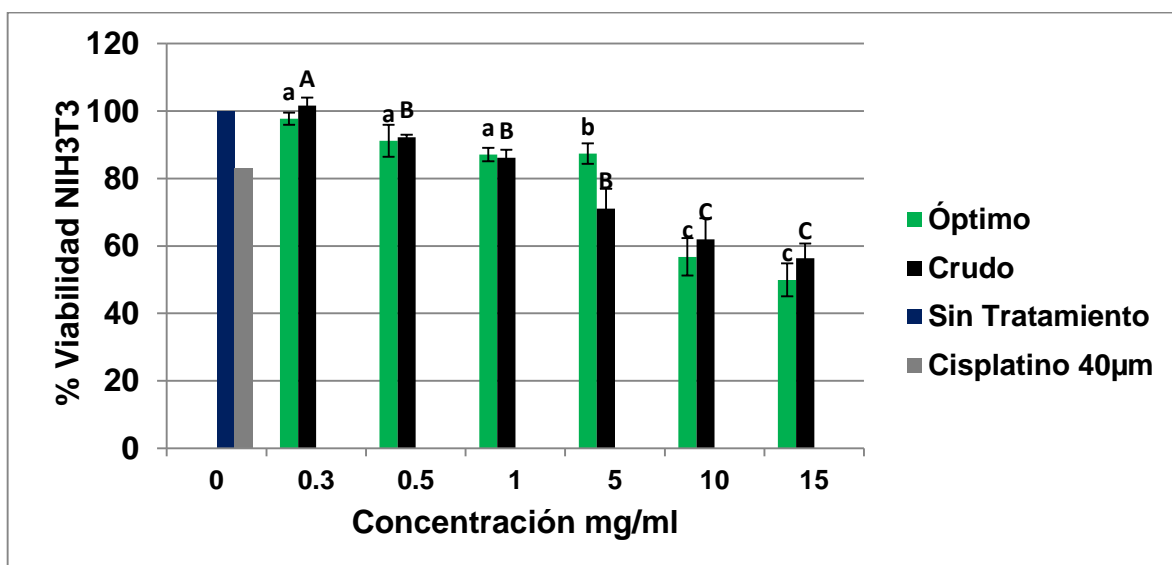
NIH3T3 ha sido anteriormente utilizada como control de especificidad para inhibir el crecimiento de células de cáncer. Guajardo Flores y col (2013), germinaron semillas de frijol negro y reportaron un porcentaje de inhibición de proliferación de células NIH3T3 de 73% en extracto de semilla cruda, y desde 30 hasta 89% en extracto de frijol germinado en diferentes tiempos de germinación estos resultados nos indican que el proceso de germinación podría disminuir el porcentaje de inhibición de proliferación células no transformadas mediante una optimización del bioproceso

#### **a Determinación de IC<sub>50</sub>**

Después de evaluar el efecto citotóxico de los extractos de **HGIC** y **HGBO** se obtuvo el **IC<sub>50</sub>** de cada uno, para determinar la concentración de extracto que disminuye la viabilidad de las células tumorales al 50%. Para ello se graficaron los porcentajes de inhibición de la línea celular, después de haberlos expuesto a los



**Fig 13.** Efecto de cisplatino y de diferentes concentraciones de extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre viabilidad de células de cáncer de mama MDAMB231. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )



**Fig 14.** Efecto de cisplatino y de diferentes concentraciones de extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre viabilidad de células control NIH3T3. Letras diferentes en la misma línea indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

extractos por seis horas, contra el logaritmo de la concentración de extracto, utilizando el programa Graphpad Prism 6.01 (**Fig 15**). De la misma manera se obtuvo el **IC<sub>50</sub>** de las harinas crudas y bioprocesadas para la línea no transformada usada como control (NIH3T3) (**Fig 16**)

La concentración de extracto de **HGIC** y **HGBO** que inhibe el 50% la viabilidad de las células de cáncer es de 52.7 y 3.4 mg/ml respectivamente. El **IC<sub>50</sub>** de la **HGIC** y de la **HGBO** fue de 61.3 y 11.2 mg/mL, respectivamente (**Cuadro 20**).

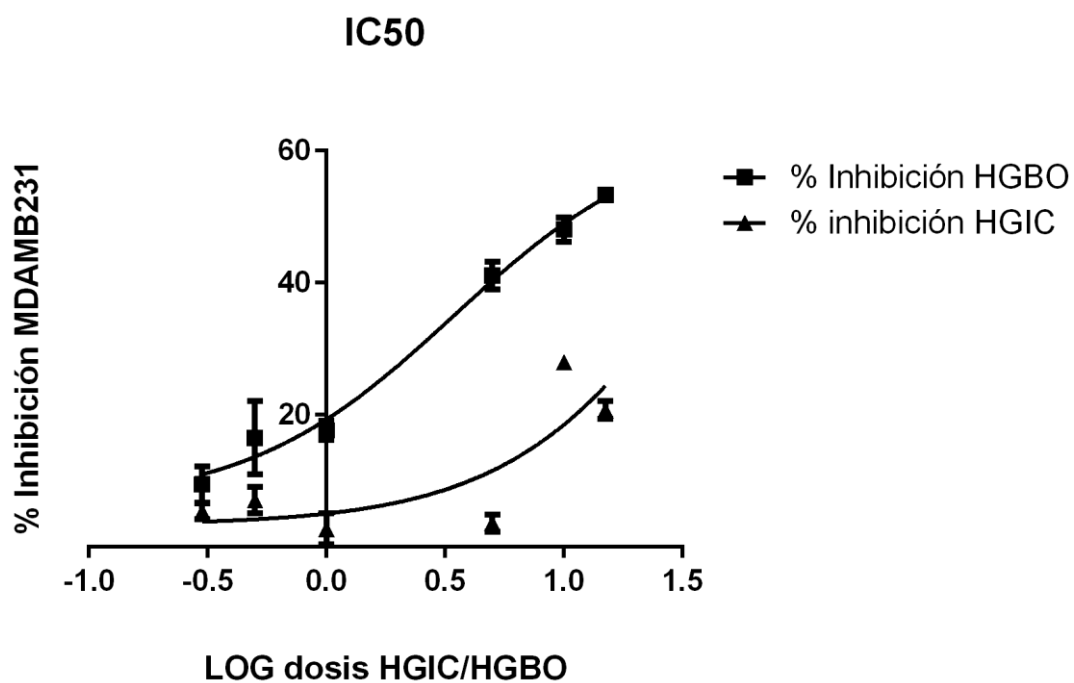
### **3 Determinación de apoptosis de células de cáncer de mama mdamb231**

Una vez que se estableció que los extractos de garbanzo afectaban la viabilidad de las células de cáncer de mama, inhibiendo su proliferación, se realizó un ensayo consistente en una doble tinción con yoduro de propidio y anexina V para determinar el porcentaje de células apoptóticas después de la exposición a los extractos de **HGIC** y **HGBO**.

La fosfatidil serina en una célula sana se encuentra hacia el interior de la célula, durante la apoptosis cambia la asimetría de la membrana y la fosfatidil serina es expuesta hacia el exterior, de esta manera es reconocida por la anexina V y se puede identificar como célula apoptótica, en el caso de yoduro de propidio nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido y con ello determinar si la apoptosis se encuentra en fase temprana o en fase tardía (también llamada necrosis) .

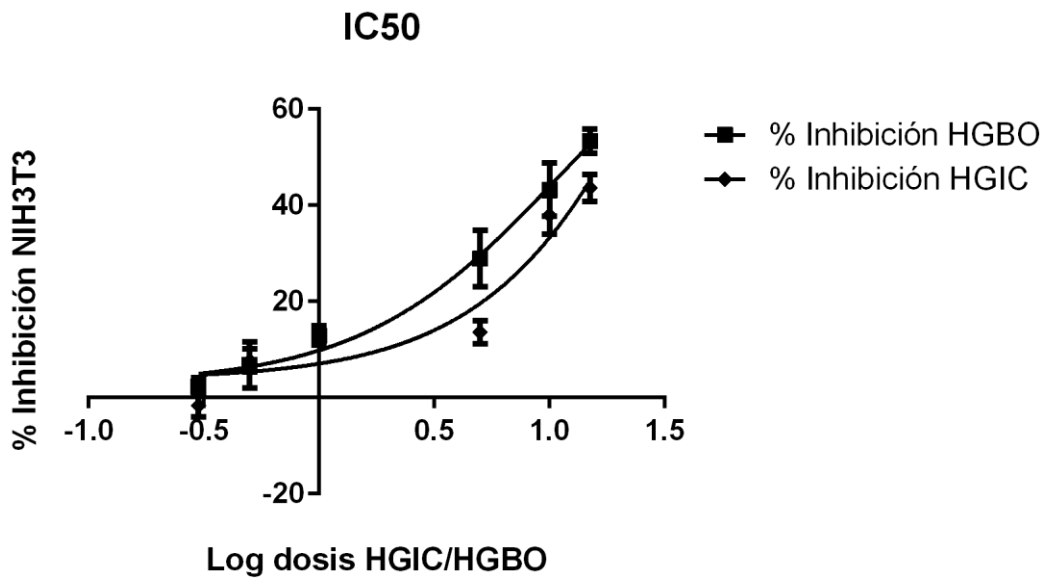
Se utilizaron las concentraciones obtenidas anteriormente de **IC<sub>50</sub>** para tratar las células de MDAMB231. Para determinar el efecto de la **HGIC** se utilizó una dosis de 52.7 mg/ml y para el **HGBO** una dosis de 3.5 mg/ml. Además, como control positivo se usó cisplatino 40µm y como control negativo células de MDAMB231 sin tratar.

Los resultados mostrados en la **Fig 17** muestra el efecto de los extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre la inducción de apoptosis en células de cáncer de mama MDAMB231. El porcentaje de células apoptóticas después de exponerse al extracto de **HGIC** fue de 41.3 y de 54.3 para **HGBO**. El fármaco utilizado como



**Fig 15.** Concentración inhibitoria de extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre línea celular de cáncer de mama MDAMB231.



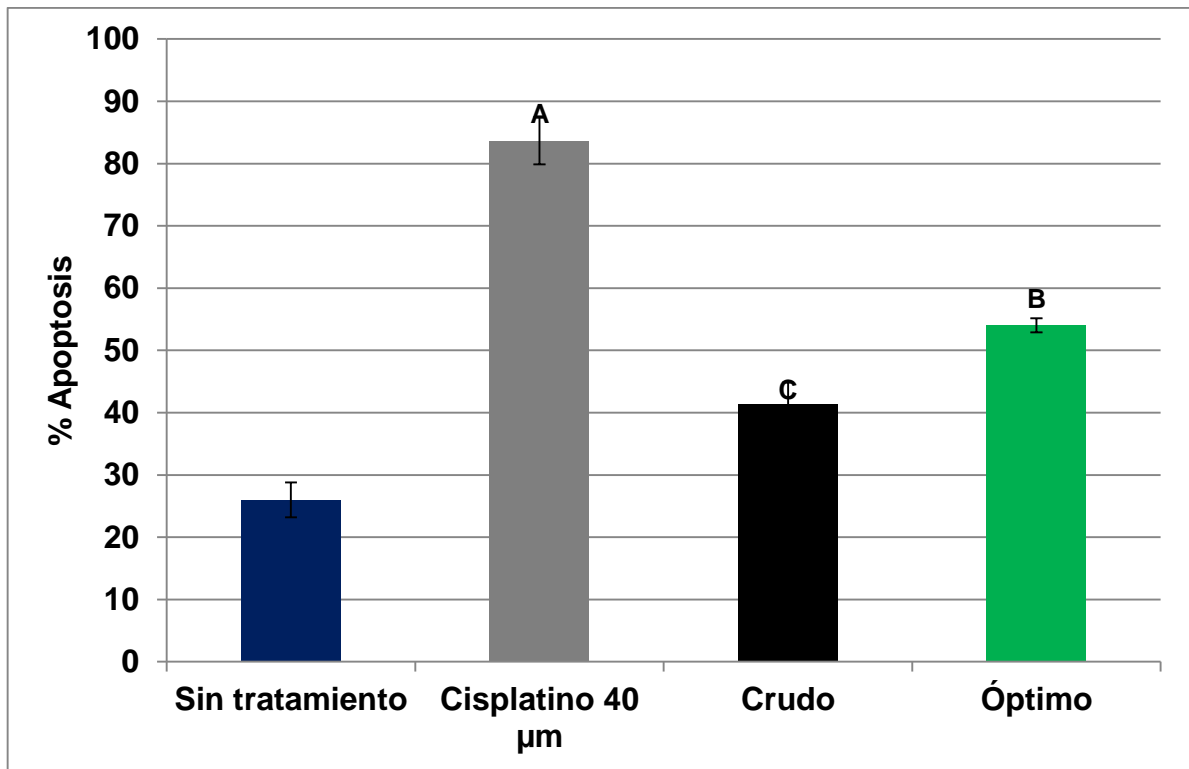


**Fig 16.** Concentración inhibitoria de extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre línea celular NIH3T3

**Cuadro 20.** Actividad antiproliferativa de extractos de **HGIC** y **HGBO**, datos expresados como **IC<sub>50</sub>**

Tratamiento	NIH3T3		MDAMB231	
	Actividad	IC <sub>50</sub> (mg / mL)	Actividad	IC <sub>50</sub> (mg / mL)
Extracto HGIC	IDD	61.3	IDD	52.7
Extracto HGBO	IDD	11.21	IDD	3.4

**IDD**= Ihibición dependiente de la dosis.



**Fig 17.** Efecto de cisplatino y de extractos de **HGIC** y **HGBO** en inducción de apoptosis en células de cancer de mama MDAMB231. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ )

control ocasionó un 83% de células apoptóticas. Utilizando la citometría de flujo es posible detectar de manera individual la apoptosis y las fases de ésta (temprana o tardía) en que se encuentra cada célula de cáncer de mama expuesta a los extractos de **HGIC** y **HGBO**.

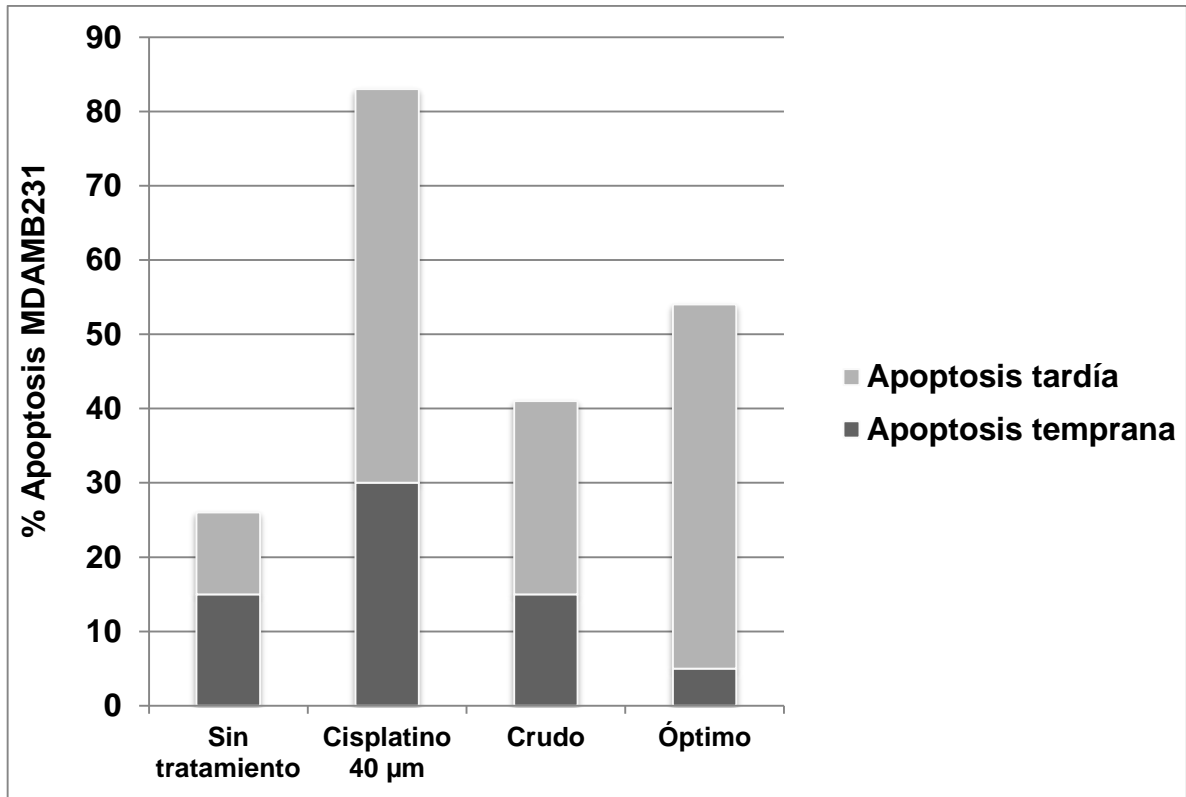
Los tratamientos utilizados inducen apoptosis temprana y tardía, nuestros resultados muestran que el extracto de **HGBO** induce un 5% de apoptosis temprana, es decir, el 5% de la población de células de cáncer de mama analizadas presentó anexina positiva lo que indica daño en la asimetría de la membrana debido a la exposición de fosfatidilserina, el 49% de las células de cáncer de mama analizadas murieron por apoptosis tardía es decir positivas para anexina y positivas para ioduro de propidio. Los extractos de **HGIC** también provocaron inducción de apoptosis temprana y tardía de 15 y 26 % respectivamente, sin embargo la inducción es menor con respecto a la de la **HGBO** (**Fig18**).

Los mismos tratamientos fueron administrados a células NIH3T3, cisplatino provocó 53% de apoptosis, la apoptosis total (temprana más tardía) fue mayor en la **HGBO** con respecto a la **HGIC**, los porcentajes de apoptosis temprana como tardía para el extracto de **HGBO** fueron de 40.07 y 24.5% respectivamente.

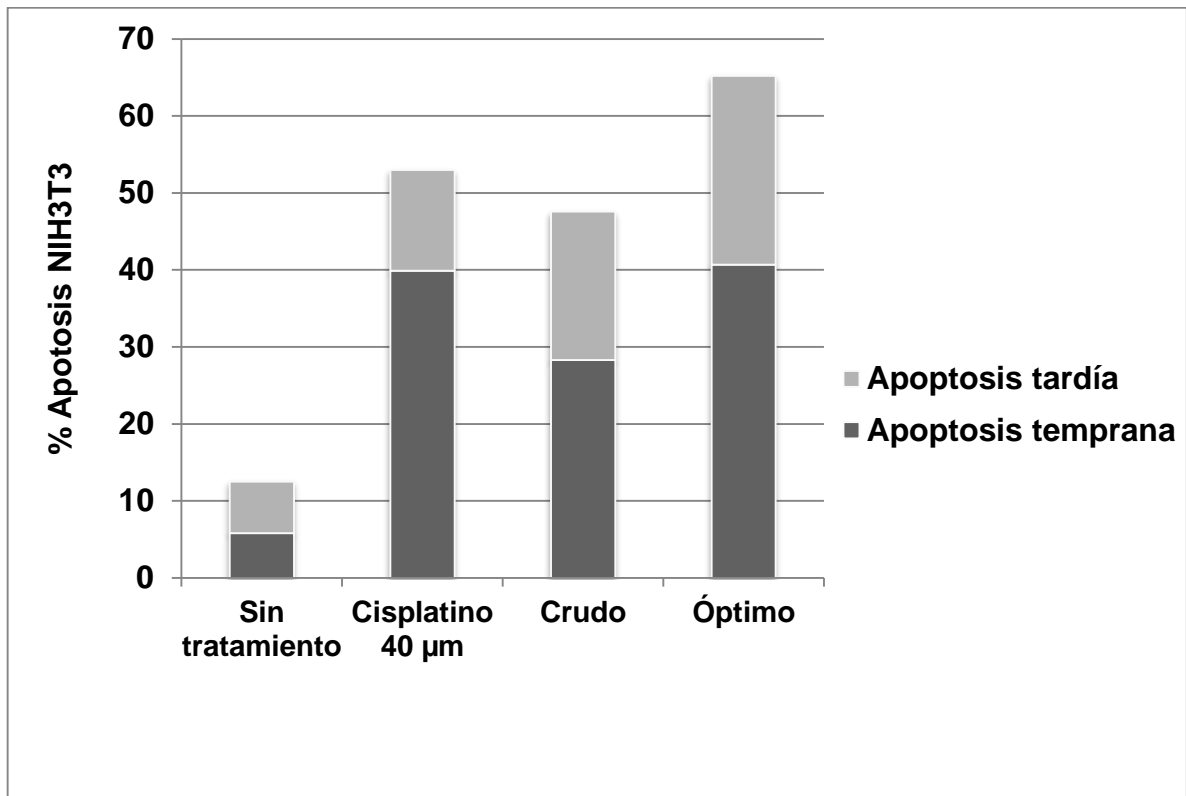
La inducción de apoptosis del extracto de **HGIC** fue de 19.3 y 28.3 % respectivamente, aunque la inducción de apoptosis fue menor que en el extracto de **HGBO** los resultados indican que así como cisplatino no presenta especificidad para células de cáncer, los extractos de garbanzo utilizados siguen el mismo comportamiento (**Fig 19**).

Diversos mecanismos para entender la inducción de apoptosis han sido estudiados previamente, en particular se ha demostrado el efecto de un compuesto bioactivo como la Genisteína (isoflavona presente en leguminosas) en la inducción de células apoptóticas de cáncer de mama MDAMB231 (Li y col, 2008).

En esta línea hay un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B la cual mejora la supervivencia celular e inhibe la apoptosis, una de las formas más abundantes de NF- $\kappa$ B es el dímero p50 y p65, la subunidad p65 es la responsable de la



**Fig 18.** Efecto de cisplatino y extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre inducción de apoptosis temprana y tardía en células de cáncer de mama MDAMB231



**Fig 19.** Efecto de cisplatino y extractos de **HGIC** y **HGBO** sobre inducción de apoptosis temprana y tardía en células de fibroblasto de ratón NIH3T3

transcripción de genes condificantes para NF-kb, Genisteína disminuye los niveles de la proteína nuclear NF-kb/p65 de manera dependiente de la concentración e inhibe la actividad de NF-κB y subsecuentemente la inhibición del estímulo antiapoptótico (Li y col, 2008).

Por otra parte, las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) a través del sistema MEK5/ERK5 promueven la proliferación y supervivencia de las células, Genisteína suprime niveles de estas proteínas de manera dependiente de la concentración y promueve la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis, demostrando que la ruta MEK5/ERK5 participa en la supervivencia celular de las células de cáncer de mama MDAMB231. Otra forma de inhibir el crecimiento celular de este tipo de cáncer de mama es mediante el arresto del ciclo celular, genisteína inhibe proliferación celular a través del arresto del ciclo celular fase G2/M justo antes de iniciar la división celular (Li y col 2008).

## VIII CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de germinación para obtener harina de garbanzo bioprocesado (**HGB**) con valores máximos de actividad antioxidante (**AAox**), compuestos fenólicos y flavonoides totales (**CFT**, **FT**) fueron: Temperatura de germinación (**TG**)=34°C / tiempo de germinación (**tG**)=171 h.

El bioproceso de germinación realizado en condiciones óptimas es una alternativa eficaz para aumentar la actividad antioxidante, los compuestos bioactivos, las proteínas y el contenido de fibra dietética de las semillas de garbanzo desi. En general el proceso de germinación optimizado mejoró la composición química de la semilla de garbanzo desi al incrementar significativamente el contenido de proteína y el de fibra dietaria (soluble, insoluble, total).

Los valores experimentales de **AAox**, **CFT**, **FT**, obtenidos aplicando las condiciones óptimas de germinación, fueron similares a los valores predichos con los modelos de predicción. Esto indica la propiedad y reproducibilidad del proceso optimizado de germinación de semillas de garbanzo.

El proceso de germinación mejoró el perfil de ácidos fenólicos aumentando significativamente el contenido de ácidos Sinápico (+ 217%), Siríngico (+ 233%), Ferúlico (+ 427%), Cumárico (+ 972%) y Elágico (+2, 256%). El incremento en los niveles de ácidos fenólicos después del bioproceso de germinación potencializa el valor nutracéutico de las semillas pigmentadas de garbanzo desi.

El extracto de harina de garbanzo desi bioprocesado optimizada (**HGBO**) presentó mayor actividad antioxidante celular (**AAox<sub>celular</sub>**) que las semillas de garbanzo desi sin procesar. El extracto HGBO inhibió al 50% la proliferación de células de cáncer de mama.

El extracto de **HGBO** mostró un efecto apoptótico hacia células de cáncer de mama de 54.3%. Estos resultados indican el efecto positivo de los compuestos bioactivos presentes en el extracto para inhibir la proliferación de células de cáncer de mama por la vía apoptótica. Sin embargo, se requiere realizar análisis de expresión de genes pro y antiapoptóticos para verificar estos resultados.



Las harinas y/o extractos de **HGBO** podrían ser una alternativa de alimentos o complementos funcionales para prevenir enfermedades crónico degenerativas y mejorar la salud humana, ya que son una fuente natural de compuestos bioactivos.

## VIII BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hady EA, Habiba RA. 2003. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LWT – Food Science and Technology* 36:285-293
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152:46-55.
- Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor-kappa B the enemy within. *Cancer Cell* 6:203-208.
- Aggarwal B, Shishodia S, Sandus, Pandey M, Sethi G. 2006. Inflammation and cancer: How hot is the link?. *Biochemical Pharmacology* 72:1605-1621
- Ahmadzadeh R, Prakkash J. 2007. The impact of germination and dehulling on nutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT-Food Science and Technology* 40:1292-1299.
- Akihisa T, Nishimura Y, Nakamura N, Roy K, Gosh P, Thakur S, Tamura T.1992. Sterols of *Cajanus cajan* and three other leguminosae seeds. *Phytochemistry* 31:1765-1768.
- Akihisa T, Yasujawa K, Yamaura M, Ukiya M, Kimura Y, Shimizu N, Arai K. 2000. Triterpene alcohol and sterol formulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2313-2319.
- Alarcón-Valdéz C, Milán-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Bello-Pérez LA, Reyes-Moreno C. 2005. Infant food from quality protein maize and chickpea: optimization for preparing and nutritional properties. *International Journal of Food Science and Nutrition* 56: 273-285
- Alves R, Almeida I, Casal S, Oliveria M. 2010. Method development and validation for isoflavones quantification in coffe. *Food Chemistry* 122: 914-919.
- Amarowicz R, Karamac M. 2002. Antioxidant activity of phenolic fractions of lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Food Lipids* 10: 1-10

- Ames BN 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221:1256-1264.
- Anderson J, Major AW. 2002. Pulses and lipaemia, short- and long- term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition* 88: 263-271.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis 16<sup>o</sup> ed. Harla, Association of Official Analytical Chemists. St. Paul, MN, EUA.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> edn. Association of Analyst Chemists. Gaithersburg, MD, EUA. Cap. 4, pp. 25; cap. 12, pp. 7; cap. 32, pp. 1-2; cap. 45, pp. 59-60.
- Atienza J, Sanz M, Herguedas A, Alejos JA, Jimenez JJ 1998.  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and  $\delta$ -tocopherol contents in dry legumes: Influences of cooking: Note. *Food Science and Technology International* 4: 437-441.
- Aydemir L, Yemenicioglu A. 2013. Potential of Turkish kabuli type chickpea and green lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *Food Science and Technology* 50: 686-694.
- Bagchi D. 2006. Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world. *Toxicology* 221: 1-3
- Bains K, Uppal V, Kaur H. 2011. Optimization of germination time and heat treatments for enhanced availability of minerals from leguminous sprouts. *Journal of Food Science and Technology* 51:1016-1020
- Balisterio D, Valmor C, Genovese M. 2013. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and *in vitro* antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. *Food Research International* 51: 8-14.
- Banafa A, Roshan S, Liu Y, Chen H, Chen M, Yang G, He G. 2013. Fucoidan induces G1 phase arrest and apoptosis through caspasas-dependent pathway and ROS induction in human Breast Cancer MCF-7 cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* 33:717-724..

- Bassel G, Fung P, Chow F, Foong J, Provar N, Cutler S. 2008. Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiology* 147:143-155.
- Beara I, Lesjak M, Orcic D, Simin N, Cetoyevic D, Bozin B. 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely related plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *Food Science and Technology* 47: 64-70.
- Benítez V, Cantera S, Aguilera Y, Mollà E, Esteban R, Diaz M, Martín-Cabrejas M. 2013. Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in nonconventional legumes. *Food Research International* 50: 64-69.
- Bernal J, Mendiola J, Ibañez E, Cifuentes A. 2011. Advances analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 758-774.
- Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters* 269:363–77.
- Bethke P, Libourel I, Jones R. 2007a. Nitric Oxide in Seed Dormancy and Germination. En: "Seed Development, Dormancy and Germination", Bradford K, Nonogaki H (ed), Blackwell Publishing, Oxford. Pp 153-175.
- Bethke P, Libourel I, Aoyama N, Chung Y, Still D, Jones R. 2007b. The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellins and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173-1188.
- Bewley J, Black M, 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination, 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Press, New York, NY, EUA, Pp 445.
- Bijak M, Bobrowski M, Borowiecka M, Podsedek A, Golanski J, Nowak P. 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia* 82: 811-817.
- Boeing H. 2013. Obesity and cancer. Best practice and research clinical. *Endocrinology and Metabolism* 27: 219-227

- Boniglia C, Cassatu B, Gargiulo R, Giammarioli S, Mosca M, Sanzini E. 2009. Content of phytoestrogens in soy-based dietary supplements. *Food Chemistry* 115: 1389-1392.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay. 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*.132: 1133-1145.
- Buhr G, Bales C. 2010. Nutritional supplements for older adults: Review and recommendations. Part II. *Journal of Nutrition for the Elderly* 29: 42-71.
- Campos Vega R, Loarca Piña G, Oomah D. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. A review. *Food Research International* 43:461-482.
- Caccialupi P, Ceci L, Siciliano R, Pignone A, Clemente D, Sonnante G. 2010. Bowman-Birk inhibitors in lentil: heterologous expression, functional characterization and anti-proliferative properties in human cancer cells. *Food Chemistry* 120: 1058-1066.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14: 303-311
- Carey L, Perou C, Dressler L, Livasy C, Geradts J, Cowan D. 2004. Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population based Carolina Breast Cancer Study. *Journal of Clinical Oncology* (Suppl): abstr 9510.
- Christensen B. 1996. Folate deficiency, cancer and congenital abnormalities: is there a connection?. *Tidsskrift for den Norske Leageforening* 116: 250-254.
- Copeland L, McDonalds MB. 1985. Principles of Seed Science and Technology 2<sup>nd</sup> edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis,ISBN 0808703617, EUA, Pp 321.
- Coppen A, Bolander-Gouaille. 2005. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B<sub>12</sub>. *Journal of Psychopharmacology* 19: 59-65
- Coussens L, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867

- Crispín M y López G. 1976. El Garbanzo: Un Cultivo Importante en México. CEVACU, CIFAP-SIN, SARH.
- Crowe J, McKersie B, Crowe L. 1989. Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposo *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 979:7-10
- Coskuner Y, Karababa E. 2003. Effect of location and soaking treatments on the cooking quality of some chickpea breeding lines. *International Journal of Food Science and Technology* 38:751-757.
- Cummings JH, Stephen AM. 2007. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition* 61:S5-S18.
- Charalampopoulos D, Rastall R. 2011. Prebiotics in foods. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 1-5
- Chasquibol N, Lengua L, Delmás I, Rivera D, Bazán D, Aguirre R, Bravo M. 2003. Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 5: 9-20.
- Chavan JK, Kadam SS, Salunkhe DK. 1989. Chickpea. En “CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization”. Vol I, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, EUA, Pp 247-288.
- Chen JC. 2003. Saikosaponin-A induces apoptotic mechanism in human breast MDAMB231 and MCF7 cancer cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 3:363-377.
- Chen D, Wan S, Yang H, Yuan J, Chan T, Dou Q. 2011. EGCC, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Advances in Clinical Chemistry* 53: 155-177
- Chong S, Gorinstein S, Jeong S, Kim D. 2012. Total polyphenols, antioxidant and antiproliferative activities of different extracts in mungbean seeds and sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition* 67:71-75
- Delahaye PE, Vásquez H, Herrera I, Garrido R. 1997. Snacks de maíz enriquecidos con fibra dietética y carotenoides de la harina de zanahoria

- (*Daucus carota*) procesados por extrusión. *Revista de la Facultad de Agronomía* 23: 235-248.
- Deshpande SS, Cheryan M. 1986. Microestructure and water uptake of *phaseolus* and winged beans. *Journal of Food Science* 51: 1218-1223.
- Deshpande SS, Damodaran S 1990. Food Legumes: Chemistry and Technology. En "Advances in Cereal Science and Technology". Vol X. Pomeranz Y (ed), *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, EUA
- Dey TB, Chakraborty S, Jain KK, Sharma A, Kuhad RC. 2016. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 53:60-74.
- Dillard CJ, Bruce German. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human Health. A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1744-1756.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82:47-95
- Dueñas M, Sarmiento T, Aguilera Y, Benítez V, Mollá E, Esteban RM, Martín-Cabrejas MA. 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.
- Duodu KG .2014. Effects of Processing on Phenolic Phytochemicals in Cereals and Legumes. *Cereals Foods World* 59: 64-70.
- Duval B, Shetty K. 2001. The simulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *Journal Food Biochemistry* 25: 361-377.
- ENA. 2013. European Nutraceutical Association: Disponible: [www.enaonline.org](http://www.enaonline.org).
- EFSA. 2012. European Food Safety Authority. Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA Journal* 10:2663.

- Egli D, TeKrony D, Heitholt J. 2005. Air temperature during seed filling and soybean germination and vigor. *Crop Science* 45:1329–1335.
- El-Adawy TA. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition* 57: 83-97.
- Emenaker NJ, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N. 2001. Short chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, Mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an *in vitro* cell culture model. *Journal of Nutrition* 131:S3041-S3046.
- Espín J, Garcisa M, Tomas F. 2007. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 67: 2986-3008.
- FAO/WHO. 1991. Protein Quality Evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 51. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Roma, Italia, Pp 66.
- FAO/WHO. 2013. Dietary Protein Quality evaluation in human nutrition. FAO food and Nutrition Paper 92. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italia, Pp 3.
- Fardet A, Rock E, Remesy C. 2008. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereal products well reflected *in vivo*?. *Journal of Cereal Science* 48:258-276.
- FDA. 2013. Food and Drug Administration. Disponible en <http://www.fda.gov/food/Dietary/Supplements/default.htm>
- Felice D, Sun J, Liu R. 2009. A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *Journal of Functional Foods* 1:109-118.
- Fernández M 1998. The Modification of Nutritional and Functional Properties of Chickpea (*Cicer arietinum* L) by Germination. Tesis Doctoral, Universidad de Arizona, AZ, EUA
- Fernández-Orozco R, Piskula M, Zielinski H, Kozłowska H, Frias J, Vidal C. 2006. Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus*



- angustifolius* L. var Zapaton. *European Food Research Technology* 223:485-502.
- Fernández-Orozco R, Frías J, Zielinski H, Muñoz R, Piskula MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. 2009. Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. *Food Science and Technology* 42: 885-892.
- Fincher GB. 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 305-346.
- Flight I, Clifton P. 2006. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: A review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition* 60:1145–1159
- Frías J, Miranda LM, Doblado R, Vidal-Valverde C. 2005. Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food Chemistry* 92:211–220
- Fontein D, Glas N, Duijmm M, Bastiaannet E, Portielje J, Van de Velde C, Liefers G. 2013. Age and the effect of physical activity on breast cancer survival: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews* 39: 958-965.
- Forssten S, Sindelar C, Ouwehand A. 2011. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*17: 410-413
- Fouad AA, Rehab FMA. 2015. Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris* Medik) sprouts. *Acta Scientiarum Polonorum / Technologia Alimentaria* 14: 233-246.
- Foulkes W, Brunet J, Stefansson I, Straume O, Chappuis P, Bejin L. 2004. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E/p27/p53/glomeruloid-microvascular-proliferation) phenotype of BRCA1 related breast cancer. *Cancer Research* 64: 830-835.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365-378.

- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillet CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR. 2007. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: Patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research* 9:R4.
- Furtado E, Mota A, Lago E, Stringheta P, Oliveira C y Martins J. 2013. Products of vegetables origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International* 51: 764-770.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31:1869–188
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *British Medical Journal* 46: 495-510.
- Gharachorloo M, Ghiassi B, Baharinia M. 2013. The effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activity of pulses. *Journal of the American Oil Chemists Society* 90:407-411.
- Geervani P. 1991. Utilization of Chickpea in India and Scope for Novel and Alternative Uses. En : “Uses of Tropical Grain Legumes”. Proceedings of Consultant’s Meeting. 27-30 March 1989. Patancheru, India: ICRISAT Center. Pp 47-54
- Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK 1991. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross cultural epidemiology. *American Journal of Clinical Nutrition* 53: 326-334.
- Ghezzi P, Bonetto V. 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3:1145-1153
- Ghiassi Tarzi B, Gharachorlo M, Baharinia M, Alireza S. 2012. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11: 1137-1143

- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125:1401-1412.
- Gillies PJ. 2007. Preemptive nutrition of pro-inflammatory states: A nutrigenomic model. *Nutrition Reviews* 65:S217–20
- Gimeno C, Lelievre E, Viau L, Malik M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N, Limami A. 2009. ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: Modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Molecular Plant* 2: 108-119.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willet WC. 1998. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the nurses health study. *Annals of Internal Medicine* 129: 517-524.
- Giron CJ, Vioque J, del Mar Yust M, Pedroche J, Alaiz M, Millan F. 2004. Effect of chickpea aqueous extracts, and protein concentrates on cell proliferation. *Journal of Medicinal Food* 7:122-129.
- Gong X, Bassel G, Wang A, Greenwood J, Bewley J. 2005. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell wall of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. *Annals of Botany* 96:1165-1173.
- González-Sarrias Q, Larrosa M, Garcia M, Tomas F. 2013. Nutraceuticals for older people: Facts, fictions and gaps in knowledge. *The European Menopause Journal* 75: 313-334
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange M, Grunwald D, Macherel D. 2005. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology* 137:157-167
- Guajardo-Flores D, Garcia Patiño M, Serna Guerrero D, Gutierrez Uribe J, Serna Saldivar S. 2012. Characterisation and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry* 134:1312-1319.

- Guajardo-Flores D, Serna-Saldivar SO, Gutiérrez-Urbe JA. 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 141:1497-1503.
- Guardado-Felix D, Serna-Saldivar SO, Cuevas-Rodríguez EO, Jacobo-Velázquez DA, Gutiérrez-Urbe JA. 2017. Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L) sprouts. *Food Chemistry*. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.046.
- Guzmán-Maldonado SH, Acosta JA, Alvarez A, Garcia S, Loarca G. 2002. Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Agricultura Técnica en Mexico* 28:159-173.
- Ha TJ, Lee BW, Park KH, Jeong SH, Kim HT, Ko JM, Baek IY, Lee JH. 2014. Rapid characterization and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean *Leguminous* species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionization/mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI/MS) analysis. *Food Chemistry* 146:270-277
- Haller C. 2010. Nutraceuticals: Has there been any progress? *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87: 137-141.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 344: 721-24.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. The definition and measurement of antioxidant in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* 18:125-126.
- Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for our health?. *Cardiovascular Research* 73:341-347.
- Han N, Gu Y, Ye C, Cao Y, Liu Z, Yin J. 2012. Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chinguii*). *Food Chemistry* 132:181-185.
- Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674

- Hancock J, Desikan R, Harrison J, Bright J, Hooley R, Neill S. 2006. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *Journal of Experimental Botany* 57:1711-1718.
- Harrington K. 2011. Biology of cancer. *Medicine* 39 : 689-692
- Hayta M, Iscimen EM. 2017. Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. *Food Science and Technology*. 77:208-216.
- Hedley CL, Cunnigham I, Jones A. 2001. Introduction. En: "Carbohydrates in Grain Legume Seeds". Hedley CL (ed), CABI Publishing, UK, pp 11-13
- Heimler D, Vignolini P, Dini M y Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3053-3056.
- Hendricks S, Taylorson R. 1974. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiology* 54:304-309.
- Hengartner, M.O. 2000. Insight review articles: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 207: 770-776.
- Hiai S, Oura H, Nakajima T. 1976. Reaction of some sapogenins and saponins with vainillin and sulfuric acid. *Plant Med* 29:116-122.
- Hilhorst H, Karssen C.1989. Nitrate reductase independent stimulation of seed germination in *Sisymbrium officinale* L. (hedge mustard) by light and nitrate. *Annals of Botany* 63:131-137
- Ho C, Izzo M. 1992. Lipid-Protein and Lipid-Carbohydrate Interactions during Extrusion. En: "Food Extrusion Science Technology", Kokini J, Ho C, Karwe M (ed), Marcel Dekker, Nueva York, NY, EUA, Pp 415- 417
- Holdsworth M, Bentsink L, Soppe W. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33-54
- Hourmant A, Pradet A. 1981. Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibitions. *Plant Physiology* 68:631-635.

- Howell K, Narsai R, Carroll, Ivanova A, Lohse M, Usadel B, Miliar A, Whelan J. 2009. Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiology* 149: 961-980.
- Howes L, Howes J, Knight D. 2006. Isoflavone therapy for menopausal flushes: Systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 55: 203-211.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4437-4444.
- Huang X, Cai W, Baojun X. 2014. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L) and mung bean (*Vigna radiate* L) with germination time. *Food Chemistry* 143: 268-276
- Hurtado M, Escobar B, Estévez AM. 2001. Mezclas legumbre/cereal por fritura profunda de maíz amarillo y de tres cultivares de frejol para consumo "snacks". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 5: 303-308
- Hussain SP, Harris CC. 2007. Inflammation and Cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal Cancer*, 121:2373–2380.
- ICRISAT 2006. Disponible en [www.icrisat.org](http://www.icrisat.org).
- Imyanitov E, Togo A, Hanso K. 2004. Searching for cancer associated gene polymorphisms: promise and obstacles. *Cancer Letter* 204:3-14
- IMFNB 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Institute of Medicine and Food and Nutrition Board, National Academy Press, Washington, DC, EUA
- Iqbal A, Ateeq N, Khalil IA, Perveem S, Saleemullah S. 2006. Physicochemical characteristics and amino acid profile of chickpea cultivars grown in Pakistan. *Journal of Food Service* 17:94-101
- Irakli MN, Samanidou VF, Biliaderis CG, Papadoyannis IN. 2012. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound

- phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry* 134: 1624–1632
- Isakoff SJ. 2010. Triple-negative breast cancer: Role of specific chemotherapy agents. *Cancer Journal* 16: 53-61
- Ishibashi N, Minamikawa T. 1990. Molecular cloning and characterization of stored mRNA in cotyledons of *Vigna unguiculata*. *Plant Cell Physiology* 31:39-44
- ILSI.1999.[http://www.ilsa.org.ar/biblioteca/ILSI\\_Europa\\_Monografias/ILSICMFuncFoods](http://www.ilsa.org.ar/biblioteca/ILSI_Europa_Monografias/ILSICMFuncFoods)
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology* 18: 299-31
- Jaruga P, Dizdaroglu M. 1996. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Research* 24:1389-1394
- Johnson C, Thavarajah D, Combs G, Thavarajah P. 2013. Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. *Food Research International* 51:107-113
- Jukantil AK, Gaur PM, Gowdal CLL, Chibbar RN. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*. 108: S11-S26. doi:10.1017/S0007114512000797
- Jung S, Murphy P, Sala I. 2008. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry* 111: 592-598
- Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962
- Kahlon T, Avena-Bustillos R, Chiu M. 2012. Garbanzo diet lower cholesterol in hamsters. *Food and Nutrition Sciences* 3:401-404
- Kalt W, Kushad MM. 2000. The role of oxidative stress and antioxidants in plant and human health: introduction to the colloquium. *Horticulture Science* 35: 572-574.

- Kaushik G, Naik SN, Satya S. 2012. Effect of domestic processing on nutrients and pesticide residues in chickpea. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 5:21-30
- Khalil A, El-Adawy T. 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. *Food Chemistry* 50:197-201
- Khalil AW, ZEB A, Mahmood F, Tariq S, Khattak AB, Shah H. 2007. Comparison of sprout quality characteristics of desi and kabuli type chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L). *Swiss Society of Food Science and Technology*. 40:937:945
- Khandelwal S, Udipi SA, Ghugre P. 2010. Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43: 526-530
- Khang DT, Dung TN, Elzaawely AA, Xuan TD. 2016. Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods* 27:2-10
- Khattak A, Zeb A, Bibi N. 2008. Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and *in vitro* protein digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry* 109: 797-801
- Knaul F, Lopez L, Lazcano E, Gómez H, Romieu I, Torres G. 2009. Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud Pública de México* 51:135-137
- Kennedy A, Rumpho M, Fox T. 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology* 100:1-6
- Kerem Z, Shashoua G. 2005. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:406-412
- Kermode AR. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Science* 9:155-19
- Khuri AA, Cornel JA. 1987. Response Surfaces Designs and Analyses. Marcel Dekker, New York NY, EUA pp1-17, 254



- King J. 1991. *The Genetic Basis of the Plant Physiological Processes*. Oxford University Press, EUA pp 347-39
- Klaus, L. 1980. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food application *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13:354-384
- Konar N, Sinan E, Demir K, Artik N. 2012. Determination of conjugated and free isoflavones in some legumes by LC- MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 25: 173-178.
- Kranner I, Colville L. 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 72: 93-105.
- Kuhnle G, Dell'Aguila C, Runswick S, Bingham S. 2009. Variability of phytoestrogen content in foods from different sources. *Food Chemistry* 113: 1184-1187.
- Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y. 2006. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer and all causes in Japan. *Journal of the American Medical Association* 296: 1255-1265.
- Lee J, Park C, Jung K, Rhee H, Yang C. 2005. Negative regulation of beta-catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335:771-776.
- Leubner-Metzger G. 2005.  $\beta$ -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant Journal* 41:133-145.
- Li W, Khan M, Yamaguchi S, Kamiya Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 46: 45-50.
- Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, Wang X, Xu J. 2008. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology in vitro* 22:1749-1753.
- Li J, Vederas J. 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier. *Science* 325:161-165.

- Lila M. 2009. Interactions Between Flavonoids that Benefit Human Health. En "Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Application". Gould K, Davies K, Winefield C. (Ed). New York, EUA. Springer Science + Bussines Media. Cap. 10. Pp 305-320.
- Liu RH 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134:3479S-3485S.
- Liu RH 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science* 46:207-219
- Liu L, Zubik L, Collins F, Marko M, Meydani M. 2004. The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis* 175: 39-49.
- López-Alarcón C, Denicola A. 2012. Evaluating the Antioxidant capacity of natural products: A review on Chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*. doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051
- López-Amorós M, Hernández T, Estrella I. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:277-283
- López-Cervantes J, Sánchez-Machado D, Rosas-Rodríguez JA. 2006. Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1105:106-110
- López-Martínez LX, Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva E, Heredia JB. 2017. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *Journal of Functional Foods* doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.002
- Losso JN. 2003. Targeting excessive angiogenesis with functional foods and nutraceuticals. *Trends in Food Science and Technology* 11: 455-468
- Ma H, Wang J, Qi H, Gao Y, Pan L, Yang Y, Wang Z, Duan M, Chen H, Cao X, Aisa H. 2013. Assessment of the estrogenic activities of chickpea (*Cicer arietinum* L) sprouts isoflavone extract in ovariectomized rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 380-386.

- Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu C. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81:703-714.
- Mantovani A. 2005. Cancer: Inflammation by remote control. *Nature* 435: 752-753.
- Marcil V, Delvin E, Seidman E, Poitras L, Zoltowska M, Garofalo C 2002. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein assembly by butyrate. *American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiology* 283:G340-G346
- Marcus A, Feeley J, Volcani T. 1966. Protein Synthesis in imbibed seeds. III Kinetics of amino acid incorporation ribosome activation, and polysome formation, *Plant Physiology* 41:1167-1172
- Martínez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. 2003. Molecular Biology of Cancer. En: "Chemotherapeutic Agents". Donald JA (ed). 6<sup>a</sup> ed. Tucson, Arizona, EUA. John Wiley and Sons, Inc. Pp 14-16
- Martínez-Villaluenga C, Kuo Y, Lambein F, Frías J, Vidal-Valverde C. 2006. Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupins (*Lupinus angustifolius* L) sprouts. *European Food Research and Technology* 224:177-186
- Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Picho O, Renou J, Kamiya Y, Nambara E, Truong H. 2009. The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology* 149: 949-960
- Mathers JC. 2002. Pulses and carcinogenesis: Potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *British Journal of Nutrition* 88: 273–279.
- Mazur WM, Duke JA, Wahala K, Rasku S, Adlercreuts H. 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Nutritional Biochemistry* 9:193-200
- Megat RMR, Azrina A, Norhaizan ME. 2016. Effect of germination on total dietary fibre and total sugar in selected legumes. *International Food Research Journal* 23:257-261

- Meredith P, Pomeranz Y. 1985. Sprouted Grain. Cap. 5. En: "Advances in Cereal Science and Technology". Vol. 6, Pomeranz Y (ed.). *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, EUA Pp 239-320
- Mercier, C. 1993. Nutritional appraisal of extruded foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 44: 545-553.
- Meskin MS, Bidlack WR, Audra JD, Douglas SL. 2005. Phytochemicals: Mechanisms of Action. CRC Press Pp 63-81, ISBN 9780849316722 - CAT# 1672
- Meydani SN, Dinarello CA. 1993. Influence of dietary fatty acids on cytokine production and its clinical implications. *Nutrition in Clinical Practice* 8:65–72.
- Meza-Junco J, Montaña A, Aguayo A. 2006. Bases moleculares del cancer. *Revista de Investigacion Clínica* 58:56-70.
- Midorikawa K, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. 2001. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochemical Biophysical Research Communications* 288: 552–557.
- Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, Armienta-Rodelo E, Cáramez-Trejo A, Mora-Escobedo R. 2000. Physicochemical and nutritional characteristics of extruded flours from fresh and hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L). *LWT- Food Science and Technology* 33:117-123
- Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, Camacho-Hernández IL, Rouzaud-Sandez O 2002. Optimization of extrusion process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) into a useful product. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1718-1728
- Milán-Carrillo J, Alarcón-Valdéz C, Gutiérrez-Dorado R, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2007. Nutritional properties of quality protein maize and chickpea extruded based weaning food. *Plant Foods for Human Nutrition* 62:31-3

- Mitchel JR, Areas JA. 1992. Structural Changes in Biopolymers during Extrusion. En: "Food Extrusion Science Technology", Kokini J, HoC, Karwe M (ed), Marcel Dekker, New York, NY, EUA, Pp 345-349
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos E, Monti D. 2014. Micronutrient-gene interactions related to inflammatory / immune response and Antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. *Mechanism of Ageing and Development*. 137:29-49.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459-481
- Mora-Rochín S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sanchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science* 52:502-508
- Moore M, Chua W, Charles K, Clarke S. 2010. Inflammation and cancer: causes and consequences. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87: 504-50
- Moreno M, Cubero JI. 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27: 465-485
- Morohashi Y, Bewley J. 1980. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons: Influence of desiccation during and following germination of the axis. *Plant Physiology* 66:637-640
- Morohashi Y. 1986. Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: A survey. *Plant Physiology* 66: 653-658
- Mudnic I, Modun D, Rastija V, Vokovic J, Brizic I, Katalinic V. 2010. Antioxidant and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry* 119:1205-1210
- Murphy PA, Hendrich S. 2002. Phytoestrogens in foods. *Advances in Food and Nutrition Research* 44:195–246
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Tuomainen T, Kurt S, Salonen J. 2008. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-ages Finnish men. *Journal of Nutrition* 100:890-895

- Myers RH. 1971. Response Surfaces Methodology. Allyn and Bacon, Boston, MA  
EUA, Pp 26-106.
- Muzquiz M, Vioque J, Clemente A, Bautista J, Millan F. 2000. Jornada  
Internacional sobre Proteínas Alimentarias. Universidad de Sevilla,  
Secretariado de Publicaciones 2000, ISBN84-472-0611-4
- Nadal MS, Moreno YM, Cubero SJ, 2004. Las Leguminosas de Grano en la  
Agricultura Moderna. *Ediciones Mundi Prensa* ISBN 84-8476-213-0
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiha T, Kamiya Y, Nambara E. 2005. Genome –  
wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination:  
epigenetic and genetic regulation o transcription in seed. *Plant Journal*  
41:697-709
- Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M. 2010. Abscisic acid and  
the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*  
20:55–67
- Ng S, Hart A, Kamm M, Stagg A, Knight S. 2009. Mechanisms of action of  
probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Disease* 15:300-310.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. 2005. Gut microorganisms, mammalian  
metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*  
3:1-8.
- Nielsen T, Hsu F, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z. 2004.  
Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype  
of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10:5367-5374
- Nonogaki H, Chen F, Bradford K. 2007. Mechanisms and Genes Involved in  
Germination Senu Stricto. En: “Seed Development, Dormancy and  
Germination”, Bradford K, Nonogaki H (ed), Blackwell Publishing, Oxford,  
Pp 264-304.
- Nonogaki H. 2008. Seed Germination and Reserve Mobilization. En: “Encyclopedia  
of Life Sciences”, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester. [www.els.net](http://www.els.net)
- Nonogaki H, Bassel G, Bewlwy J. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science*  
179: 574-581

- OMS. 2012. Obesity and Overweight. Organización Mundial de la Salud.
- Oracz K, El-Maarouf-B H, Farrant J, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Physiology* 50:452-465
- Oracz K, El-Maarouf-B H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150: 494-505
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4619-4626
- Pajak, P, Socha R, Galkowska D, Roznowsky J, Fortuna T. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry* 143: 300-306.
- Paluszczak J, Krajka- Kuzniak V, Baer-Dubowska W. 2010. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters* 192:119-125.
- Paredes-Lopez OA, Cárabez-Trejo L, Palma-Tirado, Reyes Moreno C. 1991. Influence of hardening procedure and soaking solution on cooking quality of common beans. *Plant Foods for Human Nutrition* 41:155-164
- Paucar-Menacho LM, Berhow MA, Gontijo-Mandarino JM, González de Mejía E, Chang YK. 2010. Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. *Food Chemistry* 119:636–642
- Perales-Sánchez JXK, Reyes-Moreno C, Gómez-Favela MA, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Valdez-Ortiz A, Gutierrez-Dorado R. 2014. Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by

- optimizing the germination conditions of amaranth seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 69:196-202.
- Perou C, Sorlie T, Eisen M, Van de Rijn M, Jeffrey S, Christian A, Rees C. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752
- Phillips G. 2013. Dietary fibre: A chemical category or a health ingredient?. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1:3-9
- Pittaway J K, Ahuja KDK, Cehun M, Chronopoulos A, Robertson IK, Nestel PJ 2006. Dietary supplementation with chickpeas for at least 5 weeks results in small but significant significant reductions in serum total and lowdensity lipoprotein cholesterol in adult woman and men. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50:512–518
- Preston J, Tatematsu K, Kanno Y, HoboT, Kimura M, Jikumaru Y, Yano R, Kamiya Y, Nambara E. 2009. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds: A comparative study on dormant and non-dormant accessions, *Plant Cell Physiology* 50: 1786-1800
- Prior RL, Cao G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticulture Science* 35: 588-592
- Price K, Eagles J, Fenwick G. 1988. Saponin composition of 13 varieties of legumes seed using fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 42:183-193
- Prodanov M, Sierra I, Valverde-Vidal C. 2004. Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chemistry* 84:271-277
- Puupponen RL, Nohynek LC, Meier C, KaÈhkoÈnen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey K. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujo I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. 2004. The effect of  $\alpha$ -amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct



- roles of stored and neosynthesized mRNA during germination. *Plant Physiology* 134:1598-1613
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237
- Reyes Bastidas M, Reyes Fernández E, Lopez Cervantes J, Milan Carrillo J, Loarca Piña G, Reyes Moreno C. 2010. Physicochemical, nutrition and antioxidant properties of tempe flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology International* 5:427-434
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milán-Carrillo J, Valdéz-Torres B, Zárate-Márquez E. 2000. Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh from hardened chickpeas (*Cicer arietum* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 55:219-228
- Reyes-Moreno C, Rouzand-Sánchez O, Milán-Carrillo J, Garzón-Tiznao JA, Hernández-Camacho IL. 2001. Hard-to-cook tendency of chickpea (*Cicer arietinum* L) varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1008-1020.
- Reyes-Moreno C, Cárabez-Trejo A, Paredes-López O, Ordorica-Falomir C. 1994. Physicochemical and structural properties of two bean varieties which differ in cooking time and the HTC characteristics. *LWT – Food Science and Technology* 27:331-336
- Roberfroid M, Slavin J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:461-480
- Roberts E. 1964a. A survey of the effects of chemicals treatments on dormancy in rice seed. *Plant Physiology* 17:30-43
- Roberts E. 1964b. The distribution of oxidation-reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidizing agent on dormancy in rice seed. *Plant Physiology* 17:14-29

- Roberts L, Lord J. 1979. Developmental changes in the activity of messenger RNA isolated from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiology* 64: 630-634
- Robles-Escajeda E, Das U, Ortega NM, Parra K, Francia G, Dimmock J, Varela-Ramirez A, Aguilera RJ. 2016. A novel curcumin-like dienone induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Cellular Oncology*. 39: 265-277.
- Rochfort S, Panozzo J. 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7981–7994
- Rochín-Medina JJ, Sánchez-Magaña L, Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Cuevas-Rodríguez EO, Mora-Rochín S, Valdez-Ortiz A, Reyes-Moreno C. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International Journal of Food Science and Nutrition* 66:498-504
- Rogers S, Harrington K, Rhys E, O-Charoenrat P, Eccles S. 2005. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 47-69
- Roleira F, Tavares-da-Silva E, Varela C, Costa S, Silva T, Garrido J, Borges F. 2015. Plant derived and Dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry* 183: 235-258.
- Rostagno M, Villares A, Guillamon E, Garcia A, Martinez J. 2009. Sample preparation for the analysis of isoflavones from the soy beans and soy foods. *Journal of the Chromatography A* 1216: 2-29
- Ross JA, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22:19-34
- Rosen P. 1979. The pathological classification of human mammary carcinoma; past, present and future. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 9:144-156

- Russel L, Larner V, Kurup S, Bougourd S, Holdsworth. 2000. The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential. *Development* 127: 3759-3767.
- Ryccroft, CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall RA 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 91: 878–887
- Saad S, Bedani R, Mamizuka E. 2011. Beneficios a Saude dos Probiotics e Prebiotics. En: “Probioticos e Prebioticos em Alimentos”, Saad A, Criz G, Faria A. (ed), Sao Paulo, Brazil: Editora Varela, Pp 51-84
- Saldeen K, Saldeen T. 2005. Importance of tocopherols beyond  $\alpha$ -tocopherols: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research* 25: 877-889
- Sandberg AS. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* 88:281–285
- Sangronis E, Machado CJ. 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Food LWT – Science and Technology* 40:116-120
- Satterle L, Marshall H, Tennyson J, 1979. An *in vitro* assay for the prediction of the protein efficiency ratio (PER) (q.v) of food proteins. *Journal of the American Oil Chemists´ Society* 56:103-109
- Shahidi F, Yeo JD. 2016. Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules* 21, 1216 doi:10.3390/molecules21091216 1226:2-22
- Schopfer P. 2001. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo* implications ffor the control of elongation growth. *Plant Journal* 28:679-688
- Schutz K, Sab M, With A, Graubaum H, Grunwald J, 2010. Immune modulating efficacy of a polyphenol-rich beverage on symptoms associated with the common cold: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centric clinical study. *British Journal of Nutrition* 104:1156-1164
- Segev A, Badani H, Kapulnik Y, Shomer I, Oren M, Galili S. 2010. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colors chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science* 75:S115-119

- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S. 2009. Interaction of light and hormone signals in germination seeds. *Plant Molecular Biology* 69:463-472
- Seo H, Ju J, Jang K, Shin I. 2011. Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phosphor-p-53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor  $\alpha$  - negative breast cells. *Nutrition Research* 31:139-146
- Sepulveda L, Ascacio A, Rodriguez-Herrera R, Aguilera-Carbo A, Aguilar CN. 2011. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production process. *African Journal of Biotechnology* 10:4518–4523
- Shetty K, Wahlqvist M. 2004. A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13:1-24
- Singh U, Kherdekar MS, Jambunathan R. 1982. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivars. The levels of amylase inhibitors, levels of oligosaccharides and *in vitro* starch digestibility. *Journal of Food Science* 47:510-511
- Singh GS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930
- Sing N. 2017. Pulses: an overview. *Journal of Food Science and Technology*. 54:853-857.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158
- Silva-Cristobal L. 2007. Estudio de la Digestibilidad de Carbohidratos y Capacidad Antioxidante de Leguminosas de Mayor Consumo en México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

- Simmonds MSJ. 2003. Novel drugs from botanicals sources. *Drug Discovery Today* 8:721-722
- Sliwinska E, Bassel G, Bewlwy J. 2009. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radical but of the adjacent transition zone and lower hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* 60:3587-3594
- Soler CA. 2009. Estudio de la Capacidad Antioxidante y la Biodisponibilidad de los Compuestos Fenólicos del Aceite de Oliva. Primeras Etapas en el Desarrollo de un Aceite de Oliva Funcional. Tesis de Doctorado Universidad de Lleida. Lleida, España, pp 57-59
- Song W, Derito CM, Liu MK, He X, Dong M, Liu RH. 2010. Cellular antioxidant activity of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:6621-6629
- Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Geilser S, Johnsen H. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:10869-10874
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J, Nobel A. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:8418-8423
- Sotiriou C, Neo S, McShane L, Korn E, Long P, Jazaeri A. 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 10393-10398
- Sun T, Gubler F. 2004. Molecular mechanism of gibberellins signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55:197-223.
- Swieca M, Baraniak B, Gawlik 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: 1414-1420.

- Tao W, Duan J, YANG n, Tang Y, Liu M, Qian Y. 2012. Antithrombotic phenolic compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *Fitoterapia* 83:422-425
- Tatematsu K, Nakabayashi K, Kamiya Y, Nambara E. 2008. Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 53:42-52
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellins action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 146:1368-1385
- Tolletier D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange M, Macherel D. 2007. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation, *Plant Cell* 19:1580-1589
- Tosh S, Yada S. 2010. Dietary fibres in pulses seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International* 43: 450-460
- Unlu E, Faller J. 1998. Formation of resistant starch by a twin-screw extruder. *Cereal Chemistry* 75: 346-350
- Uppal V, Bains K. 2012. Effect of germination periods and hydrothermal treatments on in vitro protein and starch digestibility of germinated legumes. *Journal of Food Science and Technology* 2:184-191
- Urbano G, Aranda P, Vilchez A, Aranda C, Cabrera L, Porres J, Lopez Jurado M. 2005. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum* L. *Food Chemistry* 93: 671-679
- USDA. Agriculture Research Service 2005. National Nutrient. Disponible en [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search).
- Varbanosa M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Noel C, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y,

- Rodermel S, Weiss D, Pichersky E. 2007. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19: 32-45.
- Verheus M, Van Gils C, Keinan L, Grace P, Bingham S, Peeters P. 2007. Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk. *Journal of Clinical Oncology* 25: 648-655.
- Vernaza M, Vermont P, González de Mejia E, Chang Y. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry* 134: 2217-2225
- Venereo-Gutierrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31:126-133.
- Villegas R, Gao T, Yang G, Li L, Elasy T, Zheng W. 2008 Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai women's health study. *American Journal of Clinical Nutrition* 87:162–167.
- Wah CS, Sharma K, Jackson MG 1997. Studies on various chemical treatments of seed meal to improve or inactive tannins. *Indian Animals Science* 47: 8-11.
- Walker W. 2008. Mechanism of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 46: S87-S91.
- Wang H, Cao GH, Prior RL 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:304-309
- Wang N, Hatcher DW, Tyler RT, Toews R, Gawalko EJ. 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 43:589-594
- Wang S, Meckling K, Marcone M, Kakuda Y, Tsao R 2011. Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents?. *Food Research International* 44: 2545-2554
- Ward H, Kuhnle G. 2010. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. *Archives of Biochemistry* 501:170-175.

- Welbourne JP. 2003. The Biology of Cancer 2003. En: "Oral and Maxillofacial Pathology. A Rationale for Diagnosis and Treatment". Marx RE, Stern D (ed), Quintessence Publishing Co, Chicago, IL, EUA, Pp. 283-90
- Weng C, Yen G.2012. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews* 38:76-87
- Willet WC. 1994. Micronutrients and cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 59: 162-165.
- Wildman REC.2007. Nutraceuticals Factors in Specific Foods. En: "Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods". 2<sup>nd</sup> Ed. CRC PRESS, Inc Boca Raton, FL, EUA, pp 7
- Williams PC, Singh U. 1987. The Chickpea-Nutritional Quality and the Evaluation of Quality in Breeding Programmes. En "The Chickpea", Saxena MC, Singh KB (ed), CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp324-356.
- Williams H, Bewley J, Greenwood J, Bourgault R, Mo B.2001. The storage cell walls in the endosperm of *Asparagus officinalis* L. seeds during development and following germination. *Seed Science Research* 11:305-315.
- Wojtyla L, Garczarska, Zalewski T, Bednarski W, Ratajczak L, Jurga S. 2006. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal Plant Physiology* 163:1207-1220.
- Wolfe K, Liu R. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8896-8907
- Wood JA, Harden S. 2006. A method to estimate the hydration and swelling properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science* 71:190-195.



- Wood JA, Grusak MA. 2007. Nutritional Value of Chickpea. En: "Chickpea Breeding and Management", Yadav SS, Redden R, Chen W, Sharma B (ed), CABI Book Info ISBN-13:9871845932145 Pp 101
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4026-4037
- Wu X, Scahuss A. 2012. Mitigation of Inflammation with foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:6703-6717
- Wu A, Song L, Feng S, Liu Y, He G, Yioe Y, Liu S, Huang D. 2012. Germination dramatically increases isoflavonoid content and diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:8120—8125
- Wuebker E, Mullen R, Hoelher K. 2001. Flooding and temperature effects on soybean germination. *Crop Science* 4:1857–1861
- Xia D, Wu X, Shi J, Yang Q, Zhang Y. 2011. Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb.Et. Zucc) and their antimicrobial activity. *Food Science and Technology* 44:347-349
- Xiao Y, Xing G, Rui X, Li W, Chen X, Jiang M, Dong M. 2014. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Fuctional Foods* 10:210-222
- Xu B, Chang S. 2007. Comparative studies on the antioxidant activities of nine common food legumes against Copper-induced human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Journal of Food Science* 72:S522-527
- Xu B, Yuan S, Chang S. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science* 72: S167-S177
- Xu B, Sam K, Chang S. 2009. Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10718-10731.

- Xu B, Sam K, Chang C. 2010. Phenolic substance characterization and chemical and cell-based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:1509-1517
- Xu B, Chang S. 2012. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry* 134:1287-1296
- Xue Z, Wen H, Zhai L, Yu Y, Li Y, Yu W, Cheng A, Wang C, Kou X. 2015. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 77:75-81
- Xue Z, Wang C, Zhai L, Yu W, Chang H, Kou X, Zhou F. 2016. Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (*Glycine max* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process. *Czech Journal of Food Science* 34: 68-78
- Yamaguchi Y, Ogawa M, Kuwuhara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16: 367-378.
- Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E. 2007. Regulation of ABA and GA Levels during Seed Development and Germination in Arabidopsis. En: "Seed Development, Dormancy and Germination", Bradford K, Nonogaki H (ed), Blackwell Publishing, Oxford, UK, Pp 224-247
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59:225-251
- Yamaoka A, Carrilo M, Nakahara T, Komiyama K. 1991. Antioxidative activities of tocotrienols on phospholipids liposomes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68:114-118
- Yoder B, Wilkinson E, Massoll N. 2007. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *Breast Journal* 13: 172-190

- Youssef, MM, Hamza, MA, Abdel-Aal, MH, Shekib, LA, El-Banna, AA. 1986. Amino acid composition and in vitro digestibility of some Egyptian foods made from faba bean (*Vicia faba* L.). *Food Chemistry* 22:225–233
- Yu-Wei L, Wang Q. 2015. Effect of processing on phenolic content and antioxidant activity of four commonly consumed pulses in China. *Journal of Horticulture*. 2:130-137.
- Zakaria Z, Hisam E, Rofiee M, Norhafizah M, Somchit M, Teh L. 2011. *In vivo* antiulcer activity of the aqueous extract of *Bauhinia pupurea* leaf. *Journal of Ethnopharmacology* 137:1047-1054
- Zhang L, Li Q, Yang X, Xia Z. 2011a. Effects of sodium selenite and germination on the sprouting of chickpeas (*Cicer arietinum* L) and its content of selenium, formonetin and biochani A in the sprouts. *Biological Trace Element Research* 146: 376-380
- Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y. 2011b. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research* 167: 27-31
- Zhao S, Zhang L, Gao P, Shao Z. 2009. Isolation and characterization of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. *Food Chemistry* 114: 869-873
- Zimmer A, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, Oliveira J, Gosmann G. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capcicum baccatum* from traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* 139:228-233.

## Abreviaturas

<b>AAox</b>	Actividad antioxidante
<b>AAox<sub>celular</sub></b>	Actividad antioxidante celular
<b>AAPH</b>	2-2'-Azobis amidinopropano
<b>AAE</b>	Aminoácidos esenciales
<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>AGCC</b>	Ácido graso de cadena corta
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Association of Oficial Analytical Chemists
<b>A<sub>w</sub></b>	Actividad acuosa
<b>BS92</b>	Blanco Sinaloa 92
<b>BHT</b>	Butirato de hidroxitolueno
<b>Bs</b>	Base seca
<b>BV</b>	Biological value
<b>BBI</b>	Bowman-Birk Inhibitor
<b>°C</b>	Grado(s) centígrado(s)
<b>CAAE</b>	Contenido de aminoácidos esenciales
<b>cm</b>	Centímetro(s)
<b>CFT</b>	Compuestos fenólicos totales
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>Col</b>	Colaboradores
<b>COX</b>	Cicloxigenasa
<b>C-PER</b>	Relación de eficiencia proteínica
<b>CQ</b>	Calificación química
<b>DCFH</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCF</b>	Diclorofluorescina
<b>DHA</b>	Ácido docosahexanoico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil picril hidrazilo
<b>DIAAS</b>	Score de aminoácidos indispensables digeribles
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media
<b>ENA</b>	Asociación Nutracéutica Europea
<b>EPA</b>	Eicosapentanoico
<b>EQ</b>	Equivalentes de Quercetina
<b>EURESTA</b>	European Research Project on Resistant Starch
<b>FAO</b>	Organización para los Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas
<b>Fig</b>	Figura(s)
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante de hierro reducido
<b>FT</b>	Flavonoides totales
<b>G6P</b>	Glucosa 6 fosfato
<b>g</b>	Gramo(s)
<b>h</b>	Hora(s)
<b>hL</b>	Hectolítrico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HGB</b>	Harina de garbanzo bioprocesado
<b>HGBO</b>	Harina de garbanzo bioprocesado optimizada
<b>HGIC</b>	Harina de garbanzo integral crudo
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución

<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria media
<b>ICRISAT</b>	International Crops Research Institute for Semi Arid Tropic
<b>ILSI</b>	Instituto Internacional de Ciencias de la Vida
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INIFAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
<b>kg</b>	Kilogramo (s)
<b>Kg/hL</b>	Kilogramo / hectolitro
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>MDAMB231</b>	Línea celular de cáncer de mama triple negativo
<b>mg</b>	Miligramo(s)
<b>mm</b>	Milímetro(s)
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Mililitro(s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MSDO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>µm</b>	Micrómetro(s)
<b>µg</b>	Microgramo(s)
<b>µM</b>	Micromolar
<b>N2</b>	Nitrógeno
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Bicarbonato de sodio
<b>NaHCO3</b>	Bicarbonato de sodio
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NIH3T3</b>	Línea celular de fibroblasto de embrión de ratón
<b>NFkB</b>	Factor de transcripción kB
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NPR</b>	Relación neta de proteína
<b>NPU</b>	Utilización neta de proteína
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORAC</b>	Oxígeno radical absorbance capacity
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>Pág</b>	Página(s)
<b>PDCAAS</b>	Digestibilidad proteínica corregida por perfil de aminoácidos
<b>PER</b>	Relación de eficiencia proteínica
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>p/p</b>	Peso / peso
<b>PUFA</b>	Ácido graso poliinsaturado
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>RRAAE</b>	Requerimiento recomendado de aminoácido esencial
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAGARPA</b>	Sría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>seg</b>	Segundo(s)
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas del ácido Tiobarbitúrico
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
<b>TG</b>	Temperatura de germinación (°C)
<b>tG</b>	Tiempo de germinación

<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>ton</b>	tonelada(s)
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
<b>var</b>	Variedad
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud