



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

**Caracterización del perfil de proteínas,
péptidos y compuestos fenólicos con
actividad biológica en genotipos de
garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**

TESIS

que presenta

MC. María Fernanda Quintero Soto

como requisito para obtener
el grado de

**Doctora en Ciencias en
Biotecnología de Alimentos**

Directores

Dr. José Ángel López Valenzuela
Dr. José Antonio Garzón Tiznado

Culiacán de Rosales, SIN, MEX

Junio de 2020

La presente investigación titulada, *Caracterización del perfil de proteínas, péptidos y compuestos fenólicos con actividad biológica en genotipos de garbanzo (Cicer arietinum L.)*, se realizó en los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y Laboratorio de Proteómica y Metabolómica del Doctorado en Ciencias en Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José Ángel López Valenzuela y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado. Como asesores participaron el Dr. Francisco Delgado Vargas, la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo y la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas. Parte de esta investigación fue financiada por el Programa de Fomento y Apoyo a la Investigación Científica (PROFAPI 2015/075) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La MC. María Fernanda Quintero Soto recibió beca de estudios de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

*“Se el alumno que quisieras tener si fueras maestro,
y se el maestro que quisieras haber tenido
cuando eras alumno.”*

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, por medio de la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB)** por permitirme realizar mis estudios de posgrado a través del **Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A los **profesores y personal** de la **FCQB** por todo el apoyo y consejos que me dieron durante mi estancia en la institución.

A la **MC. Milagros Ramírez Soto** y al **Dr. Víctor Valenzuela Herrera** gracias por el apoyo en campo y las asesorías brindadas.

A mis directores de tesis: **Dr. José Ángel López Valenzuela** gracias por su apoyo incondicional, por siempre estar al pendiente ayudándome en todo, gracias a usted soy una mejor alumna y persona, espero algún día llegar a ser al menos la mitad de buena que es usted. Al **Dr. José Antonio Garzón Tizado** gracias por su apoyo y comprensión, por su disponibilidad para formar parte de este proyecto y por toda la ayuda brindada dentro y fuera de lo académico.

A mis asesores de tesis: **Dr. Francisco Delgado Vargas**, es usted una persona muy especial para mí, gracias a sus consejos y enseñanzas he podido llegar hasta aquí, lo admiro mucho. **Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo**, gracias por todo, desde el primer día que puse un pie en el laboratorio tú te convertiste en mi ejemplo a seguir, la verdad no sé cómo agradecerle. **Dra. Nancy Yareli Salazar Salas** gracias por la confianza que me diste para poder trabajar a mi ritmo, por no pensar que estaba loca, por los consejos, por el apoyo y especialmente por tu amistad.

A la **MC. Jeanett Chávez Ontiveros** sinceramente gracias por compartir sus conocimientos conmigo y por apoyarme siempre en cada momento. Siempre contará con todo mi respeto. *¡Mil gracias!*

A los responsables del Programa Regional del Doctorado en Biotecnología, especialmente al **Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno** y a la **Dra. Edith Cuevas Rodríguez** por el apoyo brindado para que este proyecto se llevara a cabo de la mejor manera posible.

A los doctores: **Julio Montes Ávila, Gabriela López Angulo, Liliana León López, Xiomara Perales Sánchez, Fernando Salas López y Roberto Gutiérrez Dorado** por brindarme su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto, por su tiempo y disposición, muchísimas gracias.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: **Elthon Vega, Milton Vega, Gaby Servín, David González, Cynthia Torres, Brianda Leyva, Christian Grimaldi, Rodrigo Payan, Adán Vega, Glenda Saracho, Dennise Chairez, Cynthia Juárez, Itzel Apodaca, Claudia de la Rocha, Alberto Félix, Alberto Aguiar, Cristina Serrano, Diana León, Yanelit Valenzuela, David López, Jennifer Soto** y especialmente a **Cruz Fernando López y Alicia Navarro**; sin ustedes la vida en el laboratorio sería blanco y negro. Sé que el futuro les depara grandes éxitos, les deseo lo mejor de la vida. *¡Los quiero mucho!*

A **Alicia Navarro Leyva** gracias por todo lo que has aportado a mi vida, he aprendido muchos de ti, gracias por enseñarme a trabajar en equipo. Nunca espere que una niña de licenciatura tuviera tanto para ofrecer, sinceramente es un placer trabajar a tu lado. *¡Eres un Ángel!*

A **Jennifer Félix Medina** por tu amistad, por motivarme a seguir adelante y sacarme del hoyo en el que había caído. La verdad no sabes lo mucho que significa para mí tu amistad, eres de las mejores personas que he tenido el gusto de conocer. No sé qué haría sin ti. *¡Te admiro y quiero muchísimo!*

A mis amigos **Melissa López, Lourdes Valenzuela, Jessica Quintana, Anayanci Luna, Korinthia Yuriar, Alejandro Camacho, Karla Luna** y especialmente a **Antonio Magaña y Esmeralda Cuevas** por siempre darme ánimos, por aguantar mis momentos de estrés y mis pláticas sobre la tesis, *¡los adoro!*

A **Lino Carrasco Quintana y Elba Chávez Carrillo**, gracias por todo su cariño, por ofrecerme su casa y hacerme sentir como si fuera mía. *¡Los quiero!*

A **Jonhatan Carrasco Chávez** por tu apoyo y amistad incondicional. Te adoro con toda mi alma, gracias por existir, eres mi cómplice, mi respaldo, que dios te cuide y te mantenga siempre conmigo. Sé que lejos o cerca siempre estaremos juntos. *¡Te amo montones!*

A mi familia que es el pilar más grande en mi vida, gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y del trabajo y que no hay imposibles para lo que nos proponemos. A **Mamá Rosa** por siempre preocuparse por mi bienestar, eres la mejor abuela que existe en el mundo. A mi hermana **Sandy Daniela** por siempre estar al pie del cañón, por su amistad y cariño sincero. A la luz de mi vida, **Iaan Fernando**, **Maylon Alejandro** y **Tadeo** son lo más bonito que tengo. A **Mía**, mi compañera fiel, la que nunca me defrauda y siempre tiene cariño para darme. A mis padres, **Fernando** y **María Eunice** por ser los mejores padres que jamás podría haber deseado. Quiero agradecerles todo lo que han hecho por mí, por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida, espero algún día poderles devolver algo de lo mucho que me han dado. Aunque sé que siempre quedara cortó a comparación de lo que ustedes me dieron a mí. *¡Los amo!*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	4
II INTRODUCCIÓN	7
III REVISIÓN DE LITERATURA	11
A GENERALIDADES DEL GARBANZO	11
1 Origen y aspectos botánicos	11
2 Estructura del grano	13
3 Tipos de garbanzo	16
4 Estadísticas de producción	16
B CARACTERÍSTICAS NUTRIMENTALES DEL GRANO DE GARBANZO	20
1 Proteínas	20
a Globulinas	20
b Albúminas	22
2 Carbohidratos	24
a Almidón	26
3 Lípidos	26
a Ácidos grasos esenciales	26
C CARACTERÍSTICAS NUTRACÉUTICAS DEL GRANO DE GARBANZO	28
1 Compuestos fenólicos	28
2 Péptidos bioactivos	37
3 Actividad antioxidante	40
4 Actividad anticancerígena	43
5 Actividad antidiabética	44
D DIVERSIDAD GENÉTICA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE	48

GARBANZO	
E PROTEÓMICA EN LEGUMINOSAS	51
F PEPTIDÓMICA EN LEGUMINOSAS	56
G METABOLÓMICA DE LEGUMINOSAS	58
IV OBJETIVOS	61
A OBJETIVO GENERAL	61
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
V MATERIALES Y MÉTODOS	62
A MATERIALES	62
B MÉTODOS	62
1 Caracterización del perfil de compuestos fenólicos	62
a Preparación de extractos metanólicos	62
b Cuantificación de compuestos fenólicos totales	66
c Perfil de compuestos fenólicos	66
2 Caracterización del perfil de proteínas de almacenamiento	67
a Determinación de proteína total	67
b Extracción y cuantificación de proteínas de almacenamiento	67
c Separación electroforética	68
d Identificación de las proteínas	69
3 Caracterización del perfil de péptidos	71
a Análisis BIOPEP	71
b Obtención de hidrolizados proteínicos	72
c Purificación/ fraccionamiento de péptidos de los hidrolizados proteínicos	72
1) Primera purificación	72
2) Segunda purificación	72
3) Tercera purificación	73
d Perfil de péptidos de la fracción purificada	73
e Perfil de péptidos de los hidrolizados de albúminas y globulinas	73
4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos	74
a Método ABTS	74

b Método DPPH	74
c Método FRAP	74
5 Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrolizados y las fracciones peptídicas	75
a ABTS	75
b DPPH	75
6 Evaluación de la actividad antidiabética de los hidrolizados y las fracciones peptídicas	75
a Inhibición de la enzima α -amilasa	75
b Inhibición de la enzima α -glucosidasa	76
c Inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV	76
7 Análisis de acoplamiento molecular	77
8 Asociación de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante	78
9 Asociación de los hidrolizados proteínicos con la actividad antioxidante	78
10 Análisis estadístico	79
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
A ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO	80
1 Actividad antioxidante de los 18 genotipos de garbanzo evaluados	80
2 Contenido de compuestos fenólicos totales	83
3 Perfil de compuestos fenólicos	83
4 Contenido de compuestos fenólicos individuales	97
5 Asociación entre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos metanólicos	104
6 Actividad antioxidante de los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos	105
B CONTENIDO Y PERFIL DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE GARBANZO	111
1 Contenido de proteína total, albuminas y globulinas	111

2 Perfil electroforético de las principales proteínas de garbanzo	114
a Perfil de globulinas	114
b Perfil de albuminas	118
C PERFIL DE PÉPTIDOS Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS OBTENIDOS CON ALCALASA	124
1 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de hidrolizados de las principales proteínas de almacenamiento	124
2 Actividad antioxidante y antidiabética <i>in vitro</i> de fracciones proteínicas purificadas a partir del genotipo ICC3761	129
a Actividad antioxidante de las fracciones purificadas de globulinas y albúminas	129
b Actividad antidiabética de las fracciones purificadas de globulinas y albúminas	132
3 Actividad antioxidante y antidiabética <i>in vitro</i> de fracciones purificadas a partir de la fracción de albúminas FA1 del genotipo ICC3761	134
a Actividad antioxidante de fracciones purificadas a partir de FA1	134
b Actividad antidiabética de fracciones purificadas a partir de FA1	137
4 Perfil de péptidos, actividad antioxidante y antidiabética de la subfracción de albuminas FA1-5 del genotipo ICC3761	137
a Perfil de péptidos de la subfracción FA1-5	137
b Actividad antioxidante de los péptidos purificados	143
1) ABTS	143
2) DPPH	145
c Actividad antidiabética de los péptidos purificados	145
1) α -amilasa	145
2) α -glucosidasa	150
3) Dipeptidil peptidasa IV	154
VII CONCLUSIONES	163
VIII BIBLIOGRAFÍA	165
ANEXOS	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Planta de garbanzo	14
2	Estructura del grano de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.)	15
3	Tipos de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.)	17
4	Estructura teórica de un hexámero de globulinas (A) y sus subunidades α y β (B)	23
5	Estructura química de amilosa y amilopectina	27
6	Esquema de las principales rutas de biosíntesis de polifenoles	29
7	Estructuras genéricas de los principales flavonoides	31
8	Relaciones genéticas entre 23 genotipos de garbanzo de México y del ICRISAT	52
9	Espectrometría de masas en tándem	54
10	Genotipos de garbanzo tipo desi de la colección de ICRISAT	64
11	Genotipos de garbanzo tipo kabuli de la colección INIFAP	65
12	Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de los compuestos fenólicos presentes en extractos metanólicos de los genotipos ICC5383 (A) y Hoga 340 (B)	85
13	Espectros UV-Visible característicos de distintos tipos de compuestos fenólicos	86
14	Espectro de masas MS ² del ión de $m/z = 164$ del ácido <i>p</i> -cumárico	93
15	Espectro de masas MS ² del compuesto Isorhamnetina 3-O- β -D-glucopiranosido ($m/z = 477$)	96
16	Análisis de componentes principales de 18 genotipos de garbanzo usando la AA de los extractos metanólicos y el contenido de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles, isoflavonas y flavonoles	106
17	Estructuras y características químicas de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos de garbanzo	110

18	Separación por SDS-PAGE de la fracción globulinas de garbanzo	115
19	Alineamiento entre la secuencia de la proteína Legumina (Q9SMJ4) y los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas para las bandas de proteínas de 39.0 kDa (A) y 27.4 kDa (B)	117
20	Separación por SDS-PAGE de la fracción albuminas de garbanzo	120
21	Análisis de componentes principales de 18 genotipos de garbanzo usando el contenido de proteínas y la AA de los hidrolizados	130
22	Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de hidrolizados proteínicos obtenidos con alcalasa de las fracciones de globulinas (A) y albúminas (B) del genotipo ICC3761	131
23	Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de la fracción de albúminas 1 (FA1) del genotipo ICC3761	135
24	Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de la subfracción de albúminas FA1-5 del genotipo ICC3761	138
25	Identificación por espectrometría de masas del pico 3 indicado en la Figura 24	139
26	Estructura de los péptidos identificados en la subfracción FA1-5 del genotipo ICC3761	144
27	Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -amilasa: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F).	148
28	Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -Amilasa: FEI (A y B), FEL (C y D) y FIE (E y F)	151
29	Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -glucosidasa: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F).	153
30	Acoplamiento molecular de distintos péptidos con α -glucosidasa: FEI (A y B), FEL (C y D), FIE (E y F)	156
31	Acoplamiento molecular de diversos péptidos con DPP4: FEI (A y B), FEL (C y D) y FIE (E y F)	160
32	Acoplamiento molecular de diversos péptidos con DPP4: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F)	161

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Taxonomía del garbanzo	12
2	Principales países productores de garbanzo (2017)	18
3	Principales estados productores de garbanzo en México (2017)	19
4	Composición química del grano de garbanzo	21
5	Composición de aminoácidos esenciales en el grano de garbanzo	25
6	Compuestos fenólicos identificados en garbanzo	33
7	Péptidos bioactivos identificados en garbanzo	39
8	Variedades de garbanzo desarrolladas en México	49
9	Genotipos de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) utilizados	63
10	Composición de los geles concentrador y separador utilizados en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	70
11	Actividad antioxidante de extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados	81
12	Contenido de fenólicos totales en los genotipos de garbanzo	84
13	Compuestos fenólicos identificados por UPLC-ESI-MS en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados	88
14	Contenido de ácidos fenólicos en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados	98
15	Contenido de flavonoides en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados	101
16	Actividad antioxidante de estándares de compuestos fenólicos evaluados a la concentración encontrada en el extracto metanólico de ICC4418 y 50 μ M	107
17	Interacciones antioxidantes entre los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos	109
18	Contenido de proteína total, albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados	112
19	Identificación por espectrometría de masas en tándem de	116

	proteínas de la fracción de globulinas de garbanzo	
20	Análisis densitométrico de la fracción de globulinas en los 18 genotipos de garbanzo evaluados	119
21	Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de la fracción de albúminas de garbanzo	121
22	Análisis densitométrico de la fracción de albuminas en los 18 genotipos de garbanzo evaluados	123
23	Número de péptidos antioxidantes generados por hidrólisis <i>in silico</i> a partir de las secuencias de las proteínas identificadas en la fracción de albúminas y globulinas	126
24	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por ABTS de las fracciones de albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados	127
25	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH de las fracciones de albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados	128
26	Actividad antioxidante y antidiabética <i>in vitro</i> de las fracciones purificadas a partir de los hidrolizados de globulinas y albúminas del genotipo ICC3761	133
27	Actividad antioxidante y antidiabética <i>in vitro</i> de las fracciones purificadas a partir de la fracción de albuminas 1 (FA1) del genotipo ICC3761	136
28	Perfil de péptidos de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761	141
29	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761	144
30	Porcentaje de inhibición de α -amilasa de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761	147
31	Energía total, energía de interacción y número de interacciones totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima α -amilasa	149
32	Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761	152
33	Energía total, energía de interacción y número de interacciones	155

	totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima α -glucosidasa	
34	Inhibición de la enzima Dipeptidil Peptidasa IV por los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761	158
35	Energía total, energía de interacción y número de interacciones totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima Dipeptidil peptidasa IV	159

I RESUMEN

Sinaloa es el principal estado productor de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), una de las leguminosas más importantes en la nutrición humana ya que es una buena fuente de carbohidratos, proteínas y componentes bioactivos con beneficios para la salud. Las exigencias de cultivo y mercado del garbanzo requieren el desarrollo constante de nuevos materiales, los cuales han sido desarrollados mediante esquemas de mejoramiento tradicional, atendiendo principalmente características agronómicas, dejando de lado las de interés alimentario. En este sentido, diversos estudios han demostrado una correlación entre el contenido de componentes bioactivos en garbanzo y un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con estrés oxidativo. Sin embargo, existe poca evidencia de cuáles son los compuestos responsables de dichas actividades y los mecanismos por los cuales las ejercen, de tal manera que esta información pueda ser utilizada para desarrollar genotipos de garbanzo con mejores propiedades biológicas y mayor valor agregado. Por ello, el objetivo del presente proyecto fue caracterizar el perfil de compuestos fenólicos, proteínas y péptidos con actividad biológica, antioxidante (AA) para los fenólicos y AA y antidiabética para los péptidos, en genotipos de garbanzo de interés alimentario. Se cultivaron 18 genotipos de garbanzo (8 tipo desi y 10 tipo kabuli) en un mismo ambiente. Se prepararon harinas de granos maduros, las cuales se utilizaron para caracterizar el perfil de proteínas de almacenamiento mediante electroforesis unidimensional y espectrometría de masas, así como los perfiles de péptidos y compuestos fenólicos por cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas. Se evaluó la AA *in vitro* de hidrolizados proteínicos y extractos metanólicos mediante métodos colorimétricos (ABTS, DPPH y FRAP) y se identificaron los componentes responsables de dichas actividades. Los perfiles de UPLC mostraron principalmente ácidos fenólicos (sinápico hexósido, gálico, dihidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzoico, vainillina, benzoico, *p*-cumárico y feruloil hexósido) y flavonoides (catequín pentósido, catequina, miricetín-*O*-metil éter hexósido dioxihexósido pentósido, miricetín-*O*-metil éter hexósido dioxihexósido, rutina, miricetina, genisteína hexósido, isoramnetina-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido, quercetina, biocanina A, kaempferol e isoramnetina). Los ácidos fenólicos más

abundantes fueron ácido sinápico hexósido y ácido gálico con valores de 37.5 a 402.6 $\mu\text{g/g}$ b.s. y de 37.2 a 225.7 $\mu\text{g/g}$ b.s., respectivamente. Entre los flavonoides, la isoramnetina se registra por primera vez en garbanzo; catequina y catequín pentósido fueron los únicos flavonoides que se encontraron en todos los genotipos evaluados y fueron los más abundantes. Los compuestos fenólicos de los genotipos desi mostraron la mayor AA y el valor más alto fue para el genotipo ICC4418; los compuestos que contribuyeron más a la AA fueron los ácidos siríngico hexósido y gálico, así como los flavonoides isoramnetina, catequina, miricetina y quercetina. En relación con las proteínas, el perfil de albúminas presentó mayor variabilidad entre los genotipos, siendo el genotipo kabuli ICC3421 el que presentó mayor acumulación de esta fracción. En general, la fracción albúminas contiene una mayor proporción de albúmina 2S y la fracción de globulinas de legumina A2. En cuanto a los hidrolizados con alcalasa, la fracción de albúminas mostró mayor AA (ABTS: 41.52 y 423.83%; DPPH: 46.59 y 47.58%, para kabuli y desi, respectivamente) que la de globulinas (ABTS: 36.14 y 36.32%; DPPH: 25.50 y 26.73%, para kabuli y desi, respectivamente). El genotipo ICC3761 fue el más sobresaliente en cuanto a su contenido de proteínas y AA, por lo que fue seleccionado para análisis posteriores. Los hidrolizados de las fracciones de globulinas (FG) y albúminas (FG) de ICC3761 se fraccionaron (FA1, FA2, FA3, FG1, FG2, y FG3) y a cada fracción se les determinó su AA (ABTS y DPPH) y actividad antidiabética (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa), destacando FA1 por presentar los mayores porcentajes de inhibición de los radicales oxidantes (ABTS: 34.80% y DPPH: 48.87%) y las enzimas (α -amilasa: 13.69% y α -glucosidasa: 50.49%). La FA1 se separó nuevamente obteniendo seis fracciones (FA1-1, FA1-2, FA1-3, FA1-4, FA1-5 y FA1-6) que fueron evaluadas en su AA y antidiabética, sobresaliendo la fracción FA1-5 (ABTS: 78%; DPPH: 69%; α -amilasa: 66%; α -glucosidasa: 57 %), compuesta por los péptidos FEI, FEL, FIE, FKN, FGKG y MEE. Estos péptidos se purificaron y se evaluaron individualmente a la misma concentración para establecer su contribución a las actividades biológicas evaluadas. Los péptidos FEI, FEL y FIE mostraron la mayor AA por ABTS (78%) y la mejor capacidad de inhibición de la enzima dipeptidil-peptidasa IV ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{g}$). El péptido FGKG presentó los mayores valores de

inhibición de α -glucosidasa (56%) y α -amilasa (54%). El péptido más hidrofóbico (MEE) mostró el valor más alto de AA por DPPH (74%). Los resultados demuestran una amplia variabilidad en las características evaluadas y que algunos genotipos representan una buena fuente de compuestos con actividad antioxidante y antidiabética, por lo que son buenos candidatos para ser utilizados en el mejoramiento de la calidad nutracéutica del garbanzo.

ABSTRACT

Sinaloa state is the main producer of chickpea (*Cicer arietinum* L.), one of the most important legumes in human nutrition since it is a good source of carbohydrates, proteins and bioactive components that provide health benefits. The chickpea cultivation and market demands require a constant development of new materials, which have been developed through traditional breeding schemes to improve mainly agronomic traits, leaving aside those of nutritional interest. In this sense, several studies have shown a correlation between the content of bioactive components in chickpea and lower risk of developing chronic diseases related to oxidative stress. However, there is little evidence about the components responsible for these activities and their mechanisms of action, so that this information can be used to develop chickpea genotypes with better biological properties and added value. Therefore, the objective of the present project was to characterize the profiles of phenolic compounds, proteins, and peptides with biological activity, antioxidant (AA) for phenolics and AA and antidiabetic for the peptides, in chickpea genotypes of nutritional interest. Eighteen chickpea genotypes (8 desi type and 10 kabuli type) were grown in the same environment. Flours were produced from mature grains and used to characterize the storage proteins profile by one-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, as well as peptides and phenolic compounds profiles by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The *in vitro* AA of protein hydrolyzates and methanolic extracts was evaluated using colorimetric methods (ABTS, DPPH, FRAP) and the components responsible for these activities were identified. UPLC profiles showed mainly phenolic acids (sinapic hexoside, galic, dihydroxybenzoic, *p*-hydroxybenzoic, vainillin, benzoic, *p*-coumaric and ferulic hexoside) and flavonoids (catechin pentoside, catechin, myricetin-O-methyl ether hexoside deoxyhexoside pentoside, myricetin-O-methyl ether hexoside deoxyhexoside, rutin, myricetin, genistein hexoside, isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin, biochanin A e isorhamnetin). The most abundant phenolic acids were sinapic acid hexoside and gallic acid with values from 37.5 to 402.6 $\mu\text{g/g}$ d.b. and 37.2 to 225.7 $\mu\text{g/g}$ d.b., respectively. Regarding flavonoids, isorhamnetin was reported for the first time in chickpea; catechin and catechin

pentoside were the only flavonoids found in all the genotypes evaluated and they were the most abundant. The AA of the phenolic compounds was higher in the desi genotypes and the ICC4418 genotype showed the highest value; the main compounds that contributed to this activity were siringic acid hexoside and gallic acid, as well as the flavonoids isorhamnetin, catechin, myricetin and quercetin. In the case of the proteins, the albumin profile showed a wide variability among the genotypes and the kabuli genotype ICC3421 showed the greatest accumulation of this fraction. In general, a higher proportion of albumin 2S and legumin A2 were observed in the albumin and globulin fractions, respectively. As for the hydrolyzates with alcalase, the albumin fraction showed higher AA (ABTS: 41.52 and 423.83%; DPPH: 46.59 and 47.58%, for kabuli and desi, respectively) than the globulin fraction (ABTS: 36.14 and 36.32%; DPPH: 25.50% and 26.73%, for kabuli and desi, respectively). The ICC3761 genotype was the most outstanding in terms of protein content and AA, so it was selected for subsequent analyses. The albumins and globulins hydrolyzates of ICC3761 were fractionated (FA1, FA2, FA3, FG1, FG2 and FG3) and each fraction was evaluated for AA (ABTS and DPPH) and antidiabetic activity (α -amylase and α -glucosidase inhibition); FA1 showed the highest percent inhibition values of oxidant radicals (ABTS: 34.80% and DPPH: 48.87%) and enzymes (α -amylase: 13.69% and α -glucosidase: 50.49%). FA1 was separated again in six fractions (FA1-1, FA1-2, FA1-3, FA1-4, FA1-5 and FA1-3) that were evaluated for antioxidant and antidiabetic activity; FA1-5 showed the best results (ABTS: 78%; DPPH: 69%; α -amylase: 66%; α -glucosidase: 57%) and contained the peptides FEI, FEL, FIE, FKN, FGKG and MEE. These peptides were purified and evaluated individually at the same concentration to know which of them was responsible for the biological activities evaluated. The FEI, FEL and FIE peptides showed the highest AA by ABTS (78%) and the best inhibition capacity of the enzyme dipeptidyl-peptidase IV ($IC_{50} = 10 \mu\text{g}$). The FGKG peptide showed the highest inhibition values for α -glucosidase (56%) and α -amylase (54%). The most hydrophobic peptide (MEE) showed the highest AA by DPPH, (74%). The results demonstrate a wide variability in the characteristics evaluated and that some genotypes represent a good source of compounds with antioxidant and antidiabetic

activities, suggesting they are good candidates to improve the nutraceutical quality of chickpea.

II INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la tercer leguminosa más importante en el mundo después del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el chícharo (*Pisum sativum*); se cultiva en alrededor de 56 países, mayormente en desarrollo (FAOSTAT, 2020). México ocupó el décimo lugar de producción global de garbanzo en el año 2017 y el cuarto lugar de exportación de esta leguminosa después de Australia, India y Rusia (FAOSTAT, 2020). La región noroeste de México aporta un 76% de la producción nacional de garbanzo, siendo Sinaloa el principal estado productor con 87,508.74 ton (SAGARPA, 2020). El garbanzo Sinaloense ocupa un lugar importante en el mercado de exportación compitiendo con países como Turquía, España y Australia.

El garbanzo destaca como alimento por ser una buena fuente de carbohidratos, fibra dietaria, ácidos grasos insaturados, minerales, vitaminas y proteínas (Ladizinsky, 1995); además posee diversas propiedades nutraceuticas atribuidas a la presencia de una gran diversidad de fitoquímicos, entre los que destacan los compuestos fenólicos y carotenoides (Chavan y col, 1986; Chavan y col, 1989).

El grano de garbanzo constituye una fuente importante de proteínas con un contenido promedio de 25% (Chang y col, 2011; Chavez-Ontiveros y col, 2020). Estas se clasifican en albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal), prolaminas (solubles en alcohol), glutelinas (solubles en ácidos/álcalis) y proteína residual, siendo de mayor importancia las globulinas y las albúminas (Chavan y col, 1989; Chang y col, 2011). Las globulinas se subdividen en vicilina 7S y Legumina 11S, siendo estas las principales proteínas de almacenamiento del grano. En las albúminas se encuentran principalmente proteínas enzimáticas y metabólicas como lipoxigenasa y albúmina 2S (Casey y col, 1986). Las globulinas tienen bajo contenido de metionina y cisteína y disminuyen el valor nutricional del garbanzo, mientras que las albúminas son ricas en lisina y aminoácidos azufrados y contribuyen significativamente a su valor nutricional (Singh, 1985; Chavan y col, 1986; Clemente y col, 2000; Tavano y col, 2008).

Las proteínas de garbanzo se han utilizado para la elaboración de hidrolizados proteínicos, los cuales pueden ser incorporados en la dieta en forma de suplementos alimenticios. Los hidrolizados enzimáticos de proteínas son una buena fuente de

péptidos con actividades biológicas: antioxidante (AA), antihipertensiva, antiinflamatoria, antidiabética, inmunoreguladora, entre otras. Estas actividades se deben en gran medida a la estructura y composición de los péptidos, así como al método de hidrólisis utilizado (Gonzalez de Mejia y col, 2010; de Souza Rocha y col, 2015; Ghribi y col, 2015; Mojica y col, 2015; Oseguera-Toledo y col, 2015; Soares de Castro y Sato, 2015; Oseguera Toledo y col, 2016; García-Mora y col, 2017; Mojica y col, 2017; Zhang y col, 2019).

Torres-Fuentes y col (2015) evaluaron la AA de péptidos purificados a partir de proteínas de garbanzo en células Caco-2; las proteínas fueron hidrolizadas con pepsina/pancreatina y los péptidos se separaron en tres fracciones por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando cobre inmovilizado como ligando, observando que los péptidos con mejor capacidad de eliminación de radicales libres provenían de la Legumina 11S. Oseguera Toledo y col (2016) determinaron la AA de péptidos obtenidos a partir de frijol negro en un modelo de células beta-pancreáticas. Ellos observaron que las fracciones de péptidos menores a 1 kDa presentaban un efecto protector contra las especies reactivas de oxígeno de manera más eficiente con respecto a fracciones de péptidos con peso molecular superior y respecto al control. Mojica y col (2017) evaluaron la actividad hipoglucemiante de aislados de proteína hidrolizada de frijol negro; sus resultados demuestran que los niveles de glucosa se reducen significativamente en ratones al suministrarles diferentes concentraciones de hidrolizado. Además, los péptidos encontrados han sido capaces de inhibir enzimas involucradas en la diabetes, como la enzima dipeptidil-peptidasa IV. Recientemente, Silva de Lima y col (2019) estudiaron el efecto de hidrolizados proteínicos de frijol común en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, observando que los hidrolizados pueden disminuir los efectos negativos de dicha dieta, reduciendo considerablemente el aumento de peso.

Los compuestos fenólicos representan uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en las leguminosas y son considerados como antioxidantes naturales; estos compuestos reaccionan con radicales libres cediéndoles un electrón o átomo de hidrógeno, por lo que se oxidan y se transforman en radicales libres débiles, con escasos o nulos efectos tóxicos (Dueñas y col, 2004;

Dueñas y col, 2007). Los principales fenólicos en garbanzo son los flavonoides, ácidos fenólicos y procianidinas; compuestos que presentan varias actividades biológicas (e.g., AA, antiinflamatoria y antimicrobiana) (Zhao y col, 2014; Singh y col, 2017). Existe una gran variación en el contenido de fenólicos totales y AA de los genotipos de garbanzo, pero los valores más altos se han observado en genotipos tipo desi, caracterizados por sus granos pequeños y de color oscuro; en contraste con los granos tipo kabuli que son grandes y de color crema o blanco (Segev y col, 2010; Sreerama y col, 2010).

Sreerama y col (2010) determinaron la composición de fenólicos de las principales fracciones del grano en un garbanzo de la India y encontraron una mayor proporción de los flavonoles miricetina, quercetina y kaempferol en la testa, la cual también presentó la mayor AA. Aguilera y col (2011a) reportaron a isoflavonas como fenólicos principales en dos garbanzos tipo kabuli y mostraron su gran influencia en la AA. Por otro lado, Mekky y col (2015) observaron que los ácidos hidroxibenzoicos, isoflavonoides y flavonoles fueron los principales fenólicos identificados en siete cultivares de garbanzo de Egipto.

Las exigencias de cultivo y comercialización del garbanzo han obligado a los programas de mejoramiento genético a desarrollar constantemente nuevos genotipos; el programa de mejoramiento de garbanzo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado con éxito genotipos con granos extra grandes y altamente competitivos en el mercado de exportación (Valenzuela-Herrera y col, 2016). Sin embargo, el mejoramiento de garbanzo ha dejado de lado características nutrimentales y nutraceuticas importantes, por lo que la caracterización de compuestos bioactivos relacionados con características de interés puede servir como fuente de mejora de la calidad del grano en este cultivo tan importante para el noroeste de México.

Existe poca información acerca de la composición de fenólicos, proteínas, péptidos bioactivos, AA y antidiabética del germoplasma de garbanzo de México, siendo Blanco Sinaloa 92 el único genotipo investigado en su perfil de compuestos fenólicos (Aguilera y col, 2011a). Por otro lado, los genotipos desi son usados principalmente para la alimentación animal en México a pesar de su alto contenido

de fenólicos, proteínas y AA (Segev y col, 2010; Heiras-Palazuelos y col, 2013; Jadhav y col, 2015). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar compuestos fenólicos, proteínas y péptidos asociados con la AA y antidiabética de una selección de genotipos de garbanzo tipo kabuli de INIFAP y desi del banco de germoplasma del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT).

III REVISIÓN DE LITERATURA

A GENERALIDADES DEL GARBANZO

1 Origen y aspectos botánicos

Evidencias botánicas y arqueológicas sugieren que el garbanzo fue domesticado en Oriente Medio y ampliamente cultivado en la India, Cuenca Mediterránea y en Etiopía desde la antigüedad, extendiéndose posteriormente a América y Australia. Las especies silvestres del género *Cicer* se encuentran principalmente en Turquía, Irán, Afganistán y Asia Central (Duke, 1981). En Tell el-Kerkh al noroeste de Siria se encontraron evidencias arqueológicas que sugieren que la domesticación del garbanzo ocurrió alrededor de 10,000 años d. e. c., identificándose en dicha región 138 semillas/fragmentos de *Cicer arietinum* (11 completas, 65 medias y 62 fragmentos) (Tanno y Willcox, 2006). Durante el siglo XVI, los españoles y portugueses introdujeron el garbanzo al continente americano, donde las condiciones ambientales favorables permitieron su rápida expansión, principalmente en México, llegando a ser un producto de gran importancia comercial, lo que originó que se convirtiera en el principal competidor del garbanzo producido en España (ASERCA, 1997).

La mayoría de los estudios han indicado que *Cicer reticulatum* L. es el progenitor silvestre de la especie cultivada *C. arietinum* L., lo cual se debe principalmente a que morfológicamente estas dos especies presentan muchas semejanzas (Ladizinsky, 1975; Ladizinsky y Adler, 1976; Labdi y col, 1996). Además, otra característica considerada es que *Cicer* es un género monofilético y posee baja variación genética, a pesar de su alta variabilidad morfológica (Abbo y col, 2003).

En lo que respecta a su taxonomía, el garbanzo pertenece a la familia FABACEAE, subfamilia Papilionoides, tribu *Cicereae*, género *Cicer* (Cuadro 1), el cual comprende 43 especies, 9 anuales y 34 perennes (Taylor y Ford, 2007; Singh y col, 2008b), siendo *Cicer arietinum* L. la única especie domesticada, agronómica y económicamente importante (Crispín y López, 1976). Dentro de la subfamilia Papilionoides se encuentran esencialmente la totalidad de los cultivos de leguminosas importantes como el garbanzo, el cual está más estrechamente relacionado con cultivos como la alfalfa, chícharos y lenteja (Varshney y col, 2013).

Cuadro 1. Taxonomía del garbanzo

Categoría	Ejemplo
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	FABACEAE
Subfamilia	Papilionaceae
Tribu	<i>Cicereae</i>
Género	<i>Cicer</i>
Subgénero	<i>Pseudononis</i>
Sección	<i>Monocicer</i>
Serie	<i>Arietina</i>
Especie	<i>Arietinum</i>

La planta de garbanzo (Fig. 1) se reproduce por autofecundación. A este tipo de plantas se les conoce como plantas autógamas: las anteras liberan el polen sobre el propio estigma, que está receptivo, con la flor cerrada, evitando de esta manera la entrada de polen extraño (Cubero, 2002). Dicha planta es anual con una altura que varía entre 30 a 70 cm, pero los tipos altos son mayores de 1.0 m y se cultivan en la antigua Unión Soviética. El follaje está cubierto de pelos glandulares que secretan exudados altamente ácidos que se consideran importantes por conferir tolerancia a las plagas de insectos, tales como el barrenador de la vaina. Las hojas son compuestas, dispuestas en una forma alternada con 11 a 13 folíolos. Las flores son axilares, solitarias o en inflorescencias de dos o tres, de color blanco, rosa, púrpura o azul (Fig. 1). La planta cuenta con un sistema de raíces profundas y se considera un cultivo resistente. Produce nódulos en común con otras legumbres y es eficiente en la fijación de nitrógeno atmosférico, así como en la absorción de fósforo (P) en los suelos que contienen bajas cantidades del mismo (ICRISAT, 2020).

2 Estructura del grano

Las principales partes estructurales del grano de garbanzo son la testa o cubierta de la semilla, cotiledones y embrión (Fig. 2). La testa corresponde a la capa más externa del grano y tiene una fuerte influencia sobre la dureza del grano. A diferencia de los cereales, en la mayoría de las leguminosas el endospermo maduro se reduce a una pequeña capa alrededor del cotiledón o embrión (Kadam y col, 1989), por lo que es común que esta estructura se remueva junto con la testa durante el remojo del grano. El cotiledón representa del 83-84% del peso del grano seco y contiene gránulos de almidón embebidos en una matriz proteínica (Cubero, 1987; Chavan y col, 1989; Stanley y Aguilera, 2007). La estructura embrionaria incluye a la raíz y un eje embrionario corto localizado por encima y debajo del cotiledón, el cual tiene diversas hojas foliadas y termina en la punta del tallo (Kadam y col, 1989).



Fig. 1. Planta de garbanzo
ICRISAT (2020)

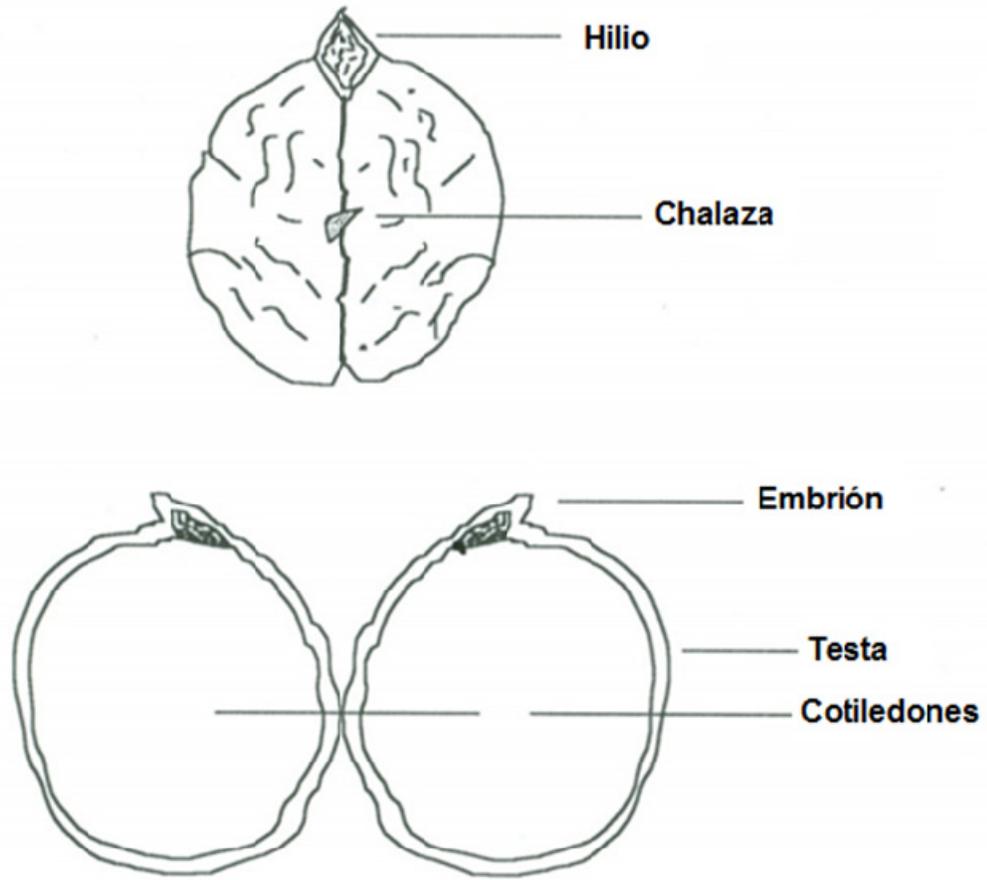


Fig. 2. Estructura del grano de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).
Kadam y col (1989).

3 Tipos de garbanzo

El garbanzo se divide en diferentes tipos basándose en las características de su semilla y distribución geográfica, siendo comercialmente importantes dos: desi y kabuli (Fig. 3). El tipo desi, cuyo origen es en India, presenta flores moradas y granos pequeños (0.1-0.3 g; 6-8 mm diámetro), angulares, de color café, marrón, amarillo, naranja, negro o verde (Chavan y col, 1989; Knights, 1994; Pittaway, 2006; Wood y col, 2008). Este tipo de garbanzo pesa de 12 a 20 g por 100 granos y es producido en el subcontinente Indio, en África Oriental, Asia Central y Mediterráneo (Cobos y col, 2007). En México, el tipo desi se emplea principalmente en la alimentación animal, mientras que en el sudeste de Asia (India) es mayormente consumido como grano entero o en distintos tipos de productos tradicionales, fermentados, fritos y endulzados (Chavan y col, 1986; Oplinger y col, 1997).

El garbanzo tipo kabuli es originario de las regiones del Mediterráneo y Medio Oriente y sus plantas presentan flores blancas. Las semillas kabuli son grandes, redondas, de color blanco a crema (Chavan y col, 1989; Knights, 1994) y pesan de 25 a 60 g por 100 granos (Taylor y Ford, 2007). Dicho garbanzo se utiliza principalmente para consumo humano y es cultivado en muchas regiones geográficas incluyendo Asia del Sur, Asia Occidental, África Norte y Oriental, Europa del Sur, América del Norte y Australia del Sur (Oplinger y col, 1997).

4 Estadísticas de producción

El garbanzo es la tercera leguminosa más importante después del frijol y el chícharo; se cultiva principalmente en países en desarrollo, los cuales contribuyen con más del 90% de la producción mundial que en el año 2017 fue de 14,792,454 ton (FAOSTAT, 2020). La India fue el principal país productor de garbanzo con cerca del 60% del total, seguido por Australia y Pakistán, mientras que México ocupó el décimo lugar con 188,939 ton en ese mismo año (Cuadro 2). A nivel nacional, Sinaloa fue el principal estado productor de garbanzo contribuyendo con un 46.2% del total en el año 2017, seguido de Sonora con 29.5% (Cuadro 3) (SAGARPA, 2020). Estos dos estados de México son los que cultivan el grano de garbanzo de más alta calidad, el cual se caracteriza por ser grande, blanco y rugoso.



Fig. 3. Tipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). A) Tipo desi; B) Tipo kabuli

Cuadro 2. Principales países productores de garbanzo (2017)

País	Producción (ton)
India	9,075,000
Australia	2,004,000
Myanmar	526,772
Etiopía	473,570
Turquía	470,000
Rusia	418,646
Pakistán	330,000
Estados Unidos de América	313,210
Irán	271,487
México	188,939
Otros países	720,830
Total	14,792,454

FAOSTAT (2020)

Cuadro 3. Principales estados productores de garbanzo en México (2017)

Estado	Producción (ton)
Sinaloa	87,508.74
Sonora	55,728.95
Michoacán	25,200.69
Guanajuato	9,070.25
Baja California Sur	7,373.83
Jalisco	2,282.30
Otros	1,774.28
Total	188,939.04

SAGARPA (2020)

B CARACTERÍSTICAS NUTRIMENTALES DEL GRANO DE GARBANZO

En el mundo, el garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es reconocido por su alto valor nutritivo para el hombre, ya que es una buena fuente de hidratos de carbono, ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico), minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, P, K y Mg), vitaminas (niacina, tiamina, ácido ascórbico) y principalmente proteínas, superando al huevo y a la leche (Ladizinsky, 1995).

1 Proteínas

El garbanzo se encuentra dentro de los granos con alto contenido de proteínas, con valores en los tipo desi de 16.7 a 30.67%, mientras que en los de tipo kabuli estos varían entre 12.6 y 29.0% (Cuadro 4) (Wood y Grusak, 2007). Las proteínas de reserva más importantes del grano son las globulinas (solubles en soluciones salinas), representando un 57% de la proteína total, seguido de las glutelinas (solubles en ácidos o bases) que se encuentran en un 18%, las albúminas (solubles en agua) con un 12% y las prolaminas (solubles en alcohol) con un 3% (Singh y Jambunathan, 1982). La distribución de estas fracciones proteínicas varía considerablemente entre el embrión, cotiledón y testa. Los cotiledones poseen la mayoría de las globulinas, glutelinas y albúminas del grano, con alrededor del 47% del total de proteína. La testa aporta alrededor del 48% de la proteína total y contiene principalmente nitrógeno no proteico y glutelinas, mientras que el embrión es relativamente rico en albúminas que constituyen el 5 % de la proteína del grano (Singh y Jambunathan, 1982; Chavan y col, 1989).

a Globulinas

Las globulinas representan alrededor del 50% de las proteínas del grano, son sintetizadas por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso e incluyen un péptido señal que las dirige al lumen donde el péptido señal es cortado co-traduccionalmente; posteriormente son exportadas al aparato de Golgi de donde son transportadas mediante vesículas a las vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSV) de la semilla donde se depositan (Casey y col, 1986; Casey y col, 1993). Las

Cuadro 4. Composición química del grano de garbanzo

Componente	Tipo desi		Tipo kabuli	
	Mín.	Máy.	Mín.	Máy.
Proteínas	16.70	30.67	12.60	29.00
Cenizas	2.04	4.20	2.00	3.90
Lípidos	2.90	7.42	3.40	8.83
Carbohidratos	50.64	64.90	54.27	70.90
Fibra cruda	3.70	13.00	1.17	4.95
Fibra dietaria	18.40	22.70	10.60	16.63

Los valores se muestran en porcentaje en bases seca. Wood y Grusak (2007)

globulinas se componen de dos grandes grupos de proteínas, 11S (legumina) y 7S (vicilina) (Casey y col, 1993).

Las globulinas 11S son los principales componentes del grano y poseen una estructura oligomérica (Fig. 4) integrada por seis subunidades que interaccionan mediante enlaces no covalentes y cuyos pesos moleculares se encuentran entre 56 y 60 kDa, por lo que el peso molecular total de la proteína es de aproximadamente 320-400 kDa (Casey y col, 1993). Bajo condiciones de separación desnaturizantes (SDS-PAGE), cada subunidad da lugar a un polipéptido ácido (α) (37-40 kDa) y uno básico (β) (24-27 kDa), los cuales están unidos por un enlace disulfuro (Sánchez-Vioque y col, 1999). La proteína vicilina 7S es trimérica, formada por subunidades de 40 a 70 kDa que pueden ser iguales o diferentes; el procesamiento proteolítico puede permitir en algunas especies la generación de polipéptidos más pequeños, mientras que el polimorfismo puede resultar de la glicosilación. Las vicilinas no pueden formar enlaces disulfuro debido a que sus subunidades carecen de cisteína. La subunidad se sintetiza como una proteína de 50 kDa, pero debido a un extensivo procesamiento postraducciona del tipo proteolítico y glicolítico se convierte en subunidades cuyo tamaño varía considerablemente. Por ejemplo, las subunidades de vicilina del chícharo se sintetizan inicialmente como polipéptidos de 47 a 50 kDa, aunque después del procesamiento postraducciona se convierten en subunidades de 12 a 33 kDa (Casey y col, 1993).

b Albúminas

La fracción de albúminas juega un papel esencial ya que incluye la mayor parte de las proteínas enzimáticas y metabólicas (Casey y col, 1993), encontrando en esta fracción proteínas como la lipoxigenasa y la albúmina 2S. La lipooxigenasa (linoleato:oxígeno oxidoreductasa) es una dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema 1,4-pentadieno (Hildebrand y col, 1988); sus sustratos principales son ácidos grasos poliinsaturados con estructura 1,4-pentadieno y entre los más comunes en el reino vegetal son los ácidos linoleico y linolénico. El producto de la reacción es un hidroperóxido conjugado ya que el doble enlace atacado por el oxígeno se traslada para entrar en

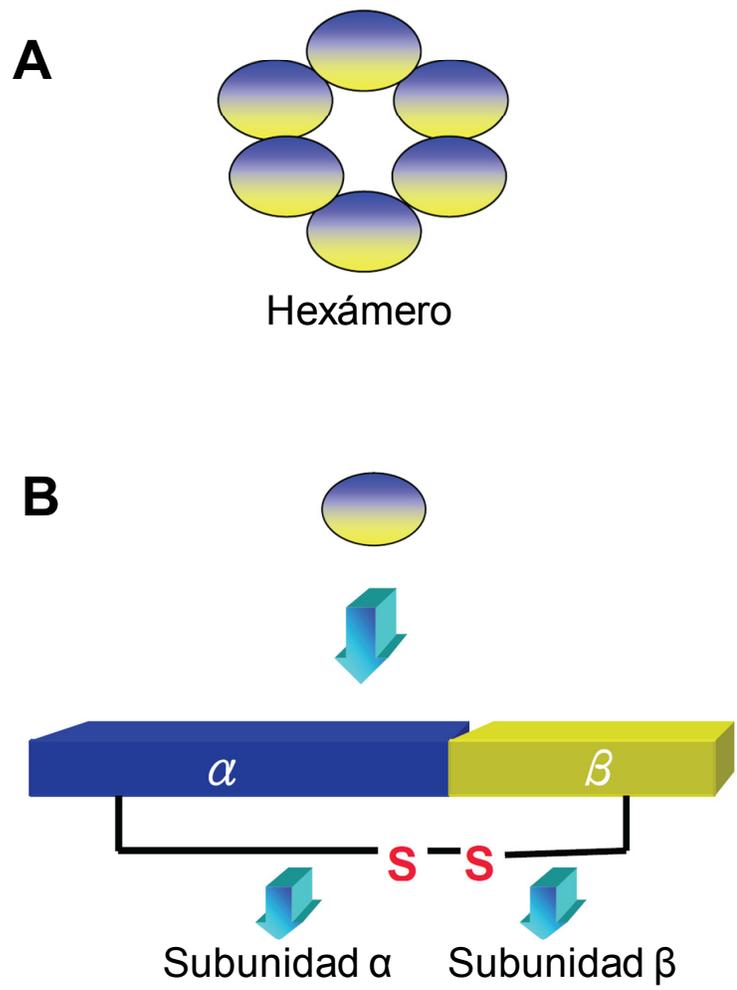


Figura 4. Estructura teórica de un hexámero de globulinas (A) y sus subunidades α y β (B) (Casey y col, 1993; Sánchez-Vioque y col, 1999).

conjugación con el doble enlace vecino (Sanz Martínez, 1991). Estos hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados actúan como intermediarios para un gran número de rutas metabólicas divergentes. Tal es el caso de la cooxidación de pigmentos, ya que para que la cooxidación tenga lugar se necesita la presencia tanto de la enzima como del ácido graso (Sanz Martínez, 1991).

La proteína albúmina 2S presenta un peso molecular de aproximadamente 20 kDa y se compone de dos polipéptidos de 10 y 12 kDa (Vioque y col, 1999). La función principal de la albúmina 2S es de reserva; sin embargo, algunos componentes han mostrado actividad biológica como inhibidores de proteasas y como proteínas de defensa (Svendsen y col, 1994).

En cuanto al valor nutricional, la fracción de albúminas presenta un mejor balance de aminoácidos esenciales que las otras fracciones del grano de garbanzo (Cuadro 5).

La composición de aminoácidos esenciales en las proteínas de garbanzo, ricas en lisina y pobres en los de tipo azufrados (cisteína y metionina), hace que sean muy útiles tanto en la alimentación animal como en la humana porque sus proteínas complementan a las de los cereales (Huïisman y Van der Poel, 1994).

2 Carbohidratos

El grano de garbanzo contiene entre 52 y 71% de carbohidratos, los cuales se dividen según su estructura química en tres grupos principales: azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos o carbohidratos complejos. El almidón forma parte de los polisacáridos o carbohidratos complejos y es el carbohidrato principal en garbanzo. El resto de los carbohidratos están constituidos por azúcares reductores y no reductores, así como fibra cruda (4.8-9.3%) (Singh, 1985). Los almidones de leguminosas como el garbanzo son llamados “carbohidratos de baja digestibilidad” debido a que son difíciles de degradar por las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa (Siva y col, 2019). Los carbohidratos de baja digestibilidad, como el almidón resistente, influyen positivamente en el funcionamiento del tracto digestivo, la flora microbiana, el nivel de colesterol en la sangre, el índice glucémico y ayuda en

Cuadro 5. Composición de aminoácidos esenciales en el grano de garbanzo

Aminoácido	Harina^a	Albuminas^a	Globulinas^a	Glutelinas^a	Infantes^b	Niños^b	Adultos^b
Treonina	3.93	5.21	2.95	4.35	4.3	3.4	0.9
Valina	4.06	455	2.95	5.05	5.5	35	1.3
Metionina	0.88	2.3	0.17	1.49			
Cisteína	1.07	2.45	0.82	0.38			
Metionina + Cisteína	1.95	4.75	0.99	1.87	4.2	2.5	1.7
Isoleucina	3.83	4.27	4.05	4.52	4.6	2.8	1.3
Leucina	7.73	7.18	7.81	7.68	9.3	6.6	1.9
Tirosina	2.83	3.44	2.58	3.3			
Fenilalanina	6.17	2.27	7.06	5.88			
Tirosina + Fenilalanina	9.01	7.71	9.64	9.18	7.2	6.3	1.9
Triptófano	0.62	0.7	0.78	1.09	1.7	1.1	0.5
Lisina	7.31	9.33	6.61	7.89	6.6	5.8	1.6
Histidina	2.86	3.02	3.08	2.99	2.6	1.9	1.6

Los valores se muestran en g/100 g de proteína. ^aTavano y col (2008); ^b Patrón de aminoácidos recomendado por la FAO. Infantes (2-5 años), niños (5-12 años)

el control de la diabetes (Nugent, 2005). Además de los beneficios potenciales para la salud asociados al consumo de estos almidones, otra ventaja positiva es su menor impacto en las propiedades sensoriales de los alimentos en comparación con las fuentes tradicionales de fibra, como granos enteros, frutas o salvado. Entre sus propiedades fisicoquímicas deseables están su capacidad de hinchamiento, viscosidad, formación de gel y capacidad de retención de agua, que lo hacen útil en una variedad de alimentos (Fuentes-Zaragoza y col, 2010). Por ser el almidón el carbohidrato mayoritario del grano a continuación se describen algunas de sus principales características.

a Almidón

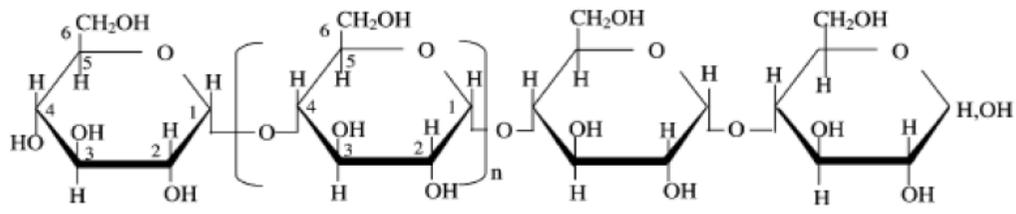
El almidón es un polisacárido complejo depositado en forma de gránulos, cuya morfología, composición química y estructura molecular varían dependiendo de la especie de la que proviene. Sus propiedades funcionales se debe en gran medida a la proporción de los polímeros que lo conforman, amilosa y amilopectina, así como a la organización física de estas dos macromoléculas en la estructura del gránulo (James y col, 2003).

La amilosa es un homopolisacárido generalmente lineal formado de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,4; por otro lado, la amilopectina es un homopolisacárido de glucosa unidas también por enlaces glucosídicos α -(1,4) y que además presenta ramificaciones con enlaces glucosídicos α -(1,6) (Fig 5). En conjunto, estos dos polisacáridos representan la mayoría del peso seco del gránulo de almidón (98-99 %) (Zeeman y col, 2007).

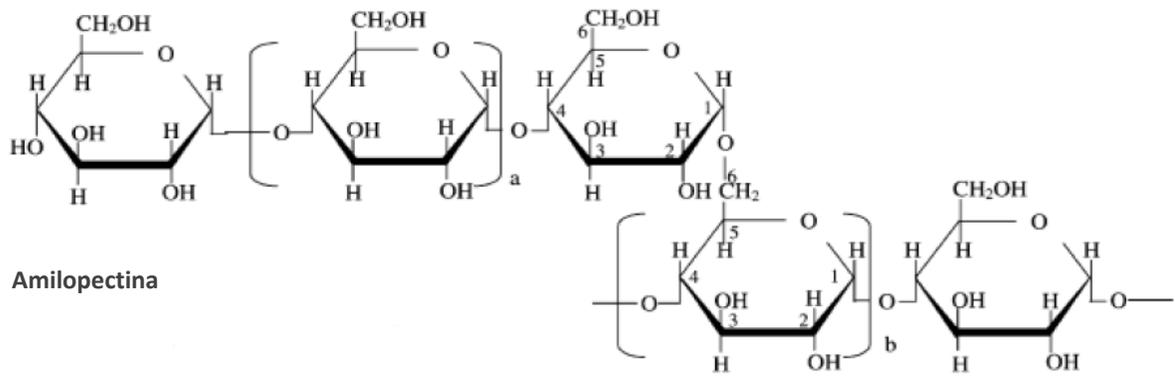
3 Lípidos

a Ácidos grasos esenciales

El grano de garbanzo cuenta con un contenido relativamente alto de grasas en comparación con otras leguminosas (Pittaway, 2006). Su contenido se encuentra en un rango de 2.90 a 7.42% en el garbanzo tipo desi y de 3.40 a 8.83% para tipo kabuli (Cuadro 4). Además, esta leguminosa posee ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) esenciales para el ser humano, los cuales representan cerca del 65% de



Amilosa



Amylopectina

Fig. 5. Estructura química de amilosa y amilopectina

Tester y Karkalas (2002)

los lípidos totales (Wood y Grusak, 2007). Los granos de garbanzo tipo desi contienen de 46-62% de ácido linoleico mientras que en los kabuli se presentan rangos de 16-70%; el ácido linolénico varía de 2-5% y 0.3-3% para desi y kabuli, respectivamente. El ácido linoleico posee actividad hipocolesterolémica y puede reducir la probabilidad de arteroesclerosis y enfermedades coronarias. El alto contenido de ácido linoleico en garbanzo podría explicar los bajos niveles de colesterol sérico en dietas que incluyen esta leguminosa (Pittaway, 2006). El contenido de aceite del garbanzo también incluye tocoferoles, tocotrienoles y esteroides (Akihisa y col, 1992). Las propiedades antioxidantes de los tocotrienoles han sido reportadas como superiores a las de los tocoferoles, además de otras propiedades biológicas importantes como la inhibición de la síntesis del colesterol (Yamaoka y col, 1991).

C CARACTERÍSTICAS NUTRACÉUTICAS DEL GRANO DE GARBANZO

Existen muchos grupos de fitoquímicos en la naturaleza, pero los más estudiados son los compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos y flavonoides. Otros fitoquímicos importantes son los fitoesteroides y terpenoides (Kalogeropoulos y col, 2010; Pennington y Fisher, 2010). Para la mayoría de los fitoquímicos todavía no se conocen bien sus bases moleculares, ni sus interacciones con otros componentes dietéticos.

1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos con potenciales actividades biológicas benéficas para la salud humana, de metabolitos secundarios más abundantes en las leguminosas (e.g., garbanzo) y reconocidos como antioxidantes naturales (Dueñas y col, 2004). Los fenólicos reaccionan con radicales libres y les ceden un electrón o un átomo de hidrógeno y se oxidan transformándose en radicales libres débiles, con escasos o nulos efectos tóxicos. Los compuestos fenólicos se originan principalmente a través de dos rutas metabólicas (Fig. 6), la ruta del ácido shikímico y la de los poliacetatos.

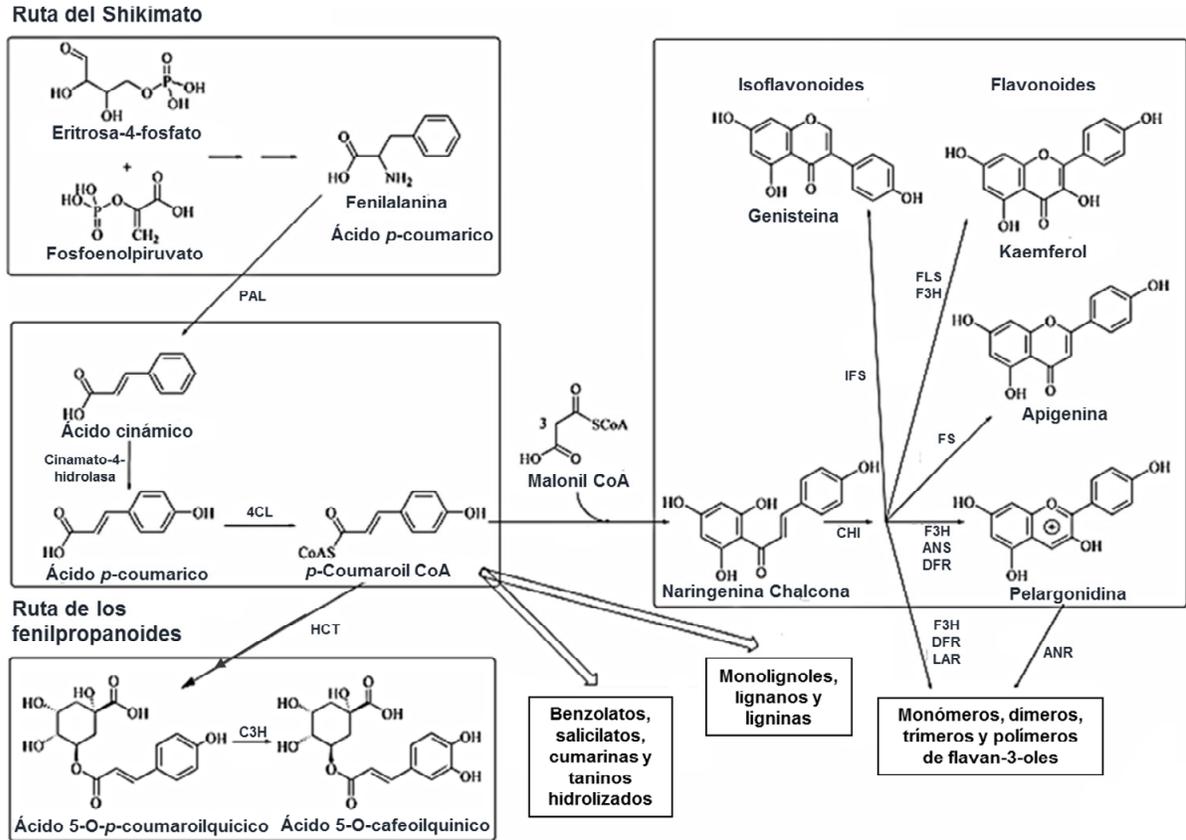


Fig. 6. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de polifenoles. PAL, fenilalanina amonio-liasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; 4CL, 4-coumaroyl:CoA-ligasa; HCT, hidroxicinamoil transferasa; C3H, *p*-cumarato-3-hidroxilasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; ANS, antocianidina sintasa; DHFR, dihidroflavonol reductasa; FS, flavona sintasa; FLS, flavonol sintasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; IFS, isoflavona sintasa; ANR, antocianina reductasa; LAR, leucoantocianina reductasa.

Cheynier y col (2013).

Sin embargo, algunos de los compuestos fenólicos considerados como principios activos de las plantas medicinales se originan a través de rutas mixtas, que combinan la vía del shikimato y del acetato (Bennick, 2002). Otra ruta alternativa, es la que se desarrolla a través de la combinación de la vía del malonato con la vía del shikimato, dando origen a los compuestos terpénicos (furano y piranocumarinas, etc.).

Los fenólicos se clasifican con base en la estructura de su esqueleto: C₆ (fenoles simples y benzoquinonas), C₆-C₁ (ácidos fenólicos y aldehídos), C₆-C₂ (acetofenonas, ácidos fenilacéticos), C₆-C₃ (ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, fenilpropanos y cromonas), C₆-C₄ (naftoquinonas), C₆-C₁-C₆ (xantonas), C₆-C₂-C₆ (estilbenos, antraquinonas), C₆-C₃-C₆ (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides), (C₆-C₃-C₆)_{2,3} (bi-, tri-, flavonoides, dímeros y trímeros de proantocianidinas), (C₆-C₃)₂ (lignanós, neolignanós), (C₆-C₃)_n (ligninas), (C₆)_n (Catecol, melaninas, florotaninos), (C₆-C₃-C₆)_n (taninos condensados) (Crozier y col, 2006)

Los fenólicos de bajo peso molecular se encuentran universalmente en las plantas superiores, algunos son comunes a un grupo de especies de plantas y otros son específicos de una especie (Harborne, 1980; Ishimaru y col, 1987; Andersen y Markham, 2005; Quideau, 2009). Los fenólicos también pueden ser clasificados en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Crozier y col, 2006). Los flavonoides se definen por su esqueleto básico (Fig. 7), que consiste en dos anillos aromáticos con seis átomos de carbono (anillo A y B) interconectados por un heterociclo de tres átomos de carbono (anillo C). De acuerdo con las modificaciones del anillo C central, los flavonoides se dividen en diferentes clases estructurales como flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles y antocianinas (Bovy y col, 2007). La mayoría de los compuestos flavonoides son acumulados como glicósidos, éstos pueden enlazarse por átomos de oxígeno o carbono. Los principales compuestos no flavonoides de importancia dietética son los ácidos fenólicos C₆-C₁, sobre todo el ácido gálico, que es precursor de los taninos hidrolizables, los hidroxicinamatos C₆-C₃ y sus derivados conjugados, así como los estilbenos C₆-C₂-C₆ (Crozier y col, 2006).

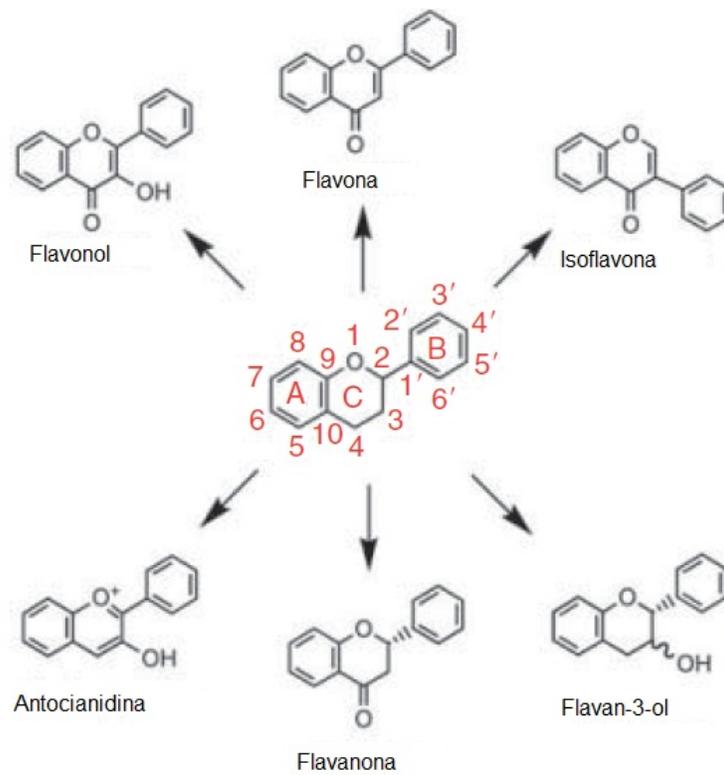


Fig. 7. Estructuras genéricas de los principales flavonoides.

Crozier y col (2006)

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran AA. Por tanto, el consumo de flavonoides protege del daño oxidativo y proporciona efectos terapéuticos en un elevado número de enfermedades, incluyendo la cardiopatía isquémica, la arterosclerosis o el cáncer (Pace-Asciak y col, 1995). La evidencia experimental de que el efecto benéfico de los flavonoides y polifenoles se debe a sus propiedades antioxidantes es variada: efecto inhibitorio sobre enzimas prooxidantes como xantina oxidasa, mieloperoxidasa, lipoxigenasa y ciclooxigenasa (Redrejo-Rodriguez y col, 2004; Meotti y col, 2008; Pauff y Hille, 2009); acción quelante de iones metálicos (Sugihara y col, 1999); y su capacidad para inactivar radicales libres (Liu y col, 2010).

Diversos estudios muestran una correlación entre el consumo de alimentos con alto contenido de compuestos fenólicos (e.g., frutas, vegetales, cereales y leguminosas) y una disminución en la incidencia de distintas enfermedades como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Anderson y col, 1999; Kushi y col, 1999; Kris-Etherton y col, 2002). El garbanzo contiene un gran número de compuestos fenólicos (Cuadro 6): Sreerama y col (2010) analizaron la composición de fenólicos en testa, cotiledón y eje embrionario, reportando contenidos de flavonoides totales casi dos veces mayor en testa (12.6 mg EC/g) con respecto al cotiledón (7.5 mg EC/g); estos valores son muy superiores a los observados por Zia-Ul-Haq y col (2008) y Heiras-Palazuelos y col (2013), quienes reportaron contenidos de flavonoides totales en granos de garbanzo tipo desi en un rango de 0.44-0.99 mg EC/g. Xu y Chang (2007) determinaron el contenido de flavonoides totales de diferentes leguminosas utilizando diferentes solventes de extracción, obteniendo mayores contenidos de flavonoides en garbanzo al utilizar acetona al 80 % (3.16 mg EC/g). Recientemente, Kaur y col (2019) determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de 10 genotipos de garbanzo tipo desi, 5 tipo kabuli y 15 genotipos silvestres provenientes de la india; ellos observaron mayores contenidos de estos metabolitos en los genotipos silvestres, seguido de los tipo desi y por último los tipo kabuli.

Cuadro 6. Compuestos fenólicos y actividades biológicas de extractos de garbanzo

Muestra	Compuesto identificado	Concentración	Actividad del extracto	Referencia
Grano entero	Fenólicos totales	0.22-0.57 mg EAG/g (kabuli) 0.24-3.62 mg EAG/g (desi)	Antioxidante y Antimutagénica	Chavez-Ontiveros y col (2020); Garzón-Tiznado y col (2013);
	Flavonoides totales	0.46-9.60 mg EC/g (desi) 2.04 mg EC/ g (kabuli)		
Grano fermentado	Fenólicos totales	2.8-8.4 mg EAG/g	Antioxidante, Inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa	Sánchez-Magaña y col (2014)
Testa y cotiledón	Fenólicos totales	75.9 mg EAG/g (testa) 15.2 mg EAG/g (cotiledón)	Antioxidante, Antihipertensiva, Inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa	Sreerama y col (2010); Sreerama y col (2012)
	Flavonoides totales	12.6 mg EC/g (testa) 7.5 mg EC/g (cotiledón)		
	Derivados de ácido hidroxibenzoico			
	Ácido gálico	4.1 μ g/g 8.5 μ g/g		
	Ácido protocatecuico	41.6 μ g/g 48.0 μ g/g		
	Ácido vanílico	9.7 μ g/g 57.9 μ g/g		
Grano entero	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	6.01-60.5 μ g/ g (kabuli) 35.1 μ g/g (desi)	Antioxidante	Aguilera y col (2011a); Magalhaes y col (2017)

EAG: Equivalentes de ácido gálico. EC: Equivalentes de catequina

Cuadro 6. Continuación...

Muestra	Compuesto Identificado	Concentración	Actividad del Extracto	Referencia
	Ácido gentísico	0.44 a 79.4 ug/g (kabuli)		
		26.0 ug/g (desi)		
Grano entero (desi)	Ácido siríngico	45.9 µg/g	Antioxidante	Magalhaes y col (2017)
Grano entero (kabuli)	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico hexósido	0.04 a 12.23 µg/g	Antioxidante	Aguilera y col (2011a)
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico aldehído	0.57 µg/g		
	Derivados de ácido hidroxicinámico			
Testa y cotiledón	Ácido <i>p</i> -cumárico	17.6 µg/g 99.4 µg/g	Antioxidante, Antihipertensiva, inhibición de α-amilasa y α-glucosidasa	Sreerama y col (2010); Sreerama y col (2012)
	Ácido cafeico	17.7 µg/g 103.3 µg/g		
	Ácido clorogénico	27.3 µg/g 77.4 µg/g		
	Ácido ferúlico	42.2 µg/g 159.2 µg/g		
	Ácido sinápico	20.6 µg/g 21.9 µg/g		
	Flavonoles			
	Quercetina	104.9 µg/g 7.01 µg/g		
	Kaempferol	97.9 µg/ g 5.5 µg/ g		
	Miricetina	28.3 µg/ g 4.4 µg/ g		

Cuadro 6. Continuación...

Muestra	Compuesto Identificado	Concentración	Actividad del Extracto	Referencia
Grano entero (kabuli)	Rutina	0.52 µg/g	Antioxidante	Aguilera y col (2011a)
	Quercetín hexósido	0.07 µg/g		
	Kaempferol 3-O-rutinósido	0.60 µg/g		
Grano entero (desi)	Quercetín-3-O-ramnósido	5.0 µg/g	Antioxidante	Magalhaes y col (2017)
	Quercetín-3-galactósido	7.2 µg/g		
	Miricetín-3-O-ramnósido	7.4 µg/g		
	Luteolín-8-C-glucósido	1.2 µg/g		
	Flavanoles			
	Catequina	147.5-178.2 µg/g	Antioxidante	Fратиanni y col (2014)
	Epicatequina	1.23-1.36 µg/g		
	Isoflavonas			
Grano entero (kabuli)	Biocanina B hexósido	6.6 µg/g	Antioxidante	Aguilera y col (2011a)
	Derivado biocanina B	22.1 µg/g		
	Biocanina A	16.1 µg/g		
	Derivado biocanina A	18.6 µg/g		
	Biocanina A 7-O-glucósido	10.3-15.1 µg/g		
	Genisteín hexósido	13.2 µg/g		
Testa y cotiledón de garbanzo	Genisteína	0.86 µg/g	Antioxidante, Antihipertensiva, Inhibición de α-amilasa y α-glucosidasa	Sreerama y col (2010); Sreerama y col (2012)
		3.2 µg/g		
	Daidzeina	3.4 µg/g (cotiledón)		

Cuadro 6. Continuación...

Muestra	Compuesto Identificado	Concentración	Actividad del Extracto	Referencia
Flavonas y Flavanonas				
Grano entero	Luteolina	0.55 µg/g	Antioxidante	Fратиanni y col (2014)
Grano entero (kabuli)	5,7-dimetoxiflavona	11.10 µg/g	Antioxidante	Aguilera y col (2011a)
	Pinocebrina malonilhexósido	1.68 µg/g		
	Pinocebrina	1.37 µg/g		

Estos investigadores sugieren que el mayor contenido de fenólicos y flavonoides en los genotipos desi y silvestres se debe al color oscuro de los granos en estos tipos de garbanzos.

A pesar de la importancia de las leguminosas y en particular el garbanzo, aún existe poca información acerca de la identidad de cada uno de los fitoquímicos presentes en el grano y su asociación con las actividades biológicas.

2 Péptidos bioactivos

En la actualidad las proteínas se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos (Lee y col, 2013). Los péptidos bioactivos se pueden definir como fragmentos específicos de las proteínas que poseen actividades biológicas importantes (Soares de Castro y Sato, 2015). Estos péptidos son secuencias de aminoácidos de tamaño pequeño, entre 2-20 residuos, inactivos dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados tras la hidrólisis de la proteína y ejercer diversos efectos benéficos para el organismo (e.g., AA, antihipertensiva, anticancerígena y efectos inmuno-moduladores) (Chen y col, 1998; Lafarga y Hayes, 2014; Singh y col, 2014).

Los péptidos bioactivos han ganado importancia tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria; a la fecha se han identificado más de 3,000 péptidos con actividades biológicas importantes y buenas propiedades funcionales. Estos péptidos están registrados en distintas bases de datos como BIOPEP, EROP-Moscow, PeptideDB y PepBank (Minkiewicz y col, 2008b). La información de estas bases de datos y las herramientas bioinformáticas BLAST y QSAR se han usado para el diseño *in silico* de péptidos con actividad biológica específica.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos determina la actividad biológica que presentan; mientras que el método usado para la obtención definirá su secuencia y estructura. Uno de los métodos más utilizados para generar péptidos bioactivos es el empleo de enzimas proteolíticas específicas; estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas y pueden actuar en enlaces éster y amida. En general, todas la proteasas tienen un cierto grado de especificidad para

el sustrato basándose en la secuencia de aminoácidos que rodean directamente el enlace que se rompe (Soares de Castro y Sato, 2015).

La base de datos MEROPS contiene información específica sobre proteasas, desde el grado de hidrólisis hasta las condiciones de hidrólisis óptimas para cada enzima (pH, temperatura, tiempo) o combinación de enzimas, condiciones que influyen considerablemente en la bioactividad del péptido (You y col, 2009; Sarmadi y Ismail, 2010; Su y col, 2011).

Los péptidos de garbanzo se han obtenido enzimáticamente con pepsina, tripsina, quimotripsina, alcalasa, flavorzima y papaína, solas o en combinación (Cuadro 7) (Real Hernandez y Gonzalez de Mejia, 2019). Las actividades biológicas más estudiadas en los hidrolizados y péptidos de garbanzo son antioxidante, hipocolesterolemica y en mayor medida antihipertensiva (Inhibición de ECA), aunque también se han asociado con propiedades anticarcinogénicas, antimicrobianas y antiinflamatorias.

Zhang y col (2011b) reportaron por primera vez un péptido antioxidante (ASN-ARG-TYR-HIS-GLU) obtenido de un hidrolizado proteínico de garbanzo; la inhibición de este péptido del radical DPPH y la peroxidación de lípidos fue mayor que la del α -tocoferol. Xue y col (2012) analizaron péptidos hidrolizados de proteínas de garbanzo, los cuales presentaron AA y antitumoral; los autores identificaron al péptido ARG-GLN-SER-HIS-PHE-ALA-ASN-GLN-PRO aislado de la fracción de albúminas como el principal responsable de la AA. Sin embargo, sólo en los péptidos ASN-ARG-TYR-HIS-GLU (Guo y col, 2014) y ARG-GLN-SER-HIS-PHE-ALA-ASN-ALA-GLN-PRO (Xue y col, 2018) se tiene evidencia que sugiere su potencial antioxidante en humanos. Por otro lado, Milan-Noris y col (2018) evidenciaron la actividad antiinflamatoria de hidrolizados proteínicos de germinados de garbanzo obtenidos mediante simulación gastrointestinal.

Cuadro 7. Péptidos bioactivos y actividades asociadas en garbanzo

Péptido	Enzima	Actividad	Referencia
ALA-LEU-GLU-PRO- ASP-HIS-ARG; THR-GLU-THR-TRP- ASN-HIS-PRO-GLU-HIS- PRO-GLU-LEU; SER-ALA-GLU-HIS-GLY- SER-LEU-HIS	Pepsina + Pancreatina	Antioxidante	Torres-Fuentes y col (2015)
ARG-GLN-SER-HIS- PHE-ALA-ASN-ALA- GLN-PRO	Alcalasa + Flavourzima	Antioxidante, Antiproliferativa, Antitumoral, Hipocolesterolémica	Kou y col (2013); Xue y col (2015); Xue y col (2018)
ASP-HIS-GLY; VAL-GLY-ASP-ILE	Alcalasa	Antioxidante	Ghribi y col (2015)
SER-GLU-GLY-GLY- LEU-ILE-THR-TRP-ASN- PRO-SER-ASN-LYS; SER-PRO-ILE-TYR- SER-ASN-LYS-PHE- GLY-LYS	Pepsina + Pancreatina	Antiinflamatoria	Milan-Noris y col (2018)

Yust y col (2012) evaluaron la actividad hipocolesterolémica de hidrolizados de proteínas de garbanzo obtenidos con alcalasa-flavourzima, observando que los hidrolizados redujeron en un 50 % la solubilidad micelar del colesterol. Recientemente, Sánchez-Chino y col (2019) observaron una disminución en la concentración de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en ratones alimentados con una dieta hipercalórica y con hidrolizados de proteínas de garbanzo; los autores explican que los aminoácidos hidrofóbicos podrían quedar expuestos durante la hidrólisis y competir con el colesterol en la formación de lipoproteínas, disminuyendo la absorción intestinal. Estos estudios demuestran el potencial de los hidrolizados de proteína de garbanzo como ingredientes bioactivos.

3 Actividad antioxidante

El garbanzo contiene compuestos antioxidantes, los cuales son sustancias que retrasan, previenen o eliminan el daño oxidativo de una molécula (Saxena y col, 2007). Las células en proliferación como las del sistema inmunológico son particularmente susceptibles al estrés oxidativo, el cual se define como el estado celular caracterizado por un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o reducción de defensas antioxidantes (Donkena y col, 2010). Las ROS pueden alterar la estructura de las membranas lipídicas y del ADN, incluyendo modificaciones de bases, ruptura de la cadena y rearrreglos cromosómicos que pueden causar alteraciones en los patrones de metilación (Donkena y col, 2010).

La AA de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como del peso molecular. En flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C2 y C3 en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C (Velioglu y col, 1998).

Los compuestos antioxidantes más estudiados son los fenólicos. Dueñas y col (2004) analizaron la AA en testa y cotiledón de dos variedades de lenteja y chícharo, encontrando una mayor AA en testa, la cual relacionaron con diferencias en la cantidad y tipos de compuestos fenólicos (flavononas, flavanoles y proantocianidinas)

que contiene. Xu y col (2007) y Oomah y col (2011) reportaron que el contenido de fenólicos totales de distintas leguminosas mostró una correlación positiva y significativa con su AA; sin embargo, no reportaron la identidad de los compuestos fenólicos responsables.

Zia-Ul-Haq y col (2008) reportaron valores de AA (ORAC) para garbanzo tipo desi de la India en un rango de 858 a 1140 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ (bs). En contraste, Aguilera y col (2011a) encontraron valores ORAC de 27.8 y 16.4 $\mu\text{mol ET}/\text{g}$ en las variedades de garbanzo tipo kabuli Castellano y Sinaloa, respectivamente; los autores atribuyeron estas actividades a la presencia de compuestos fenólicos como hidroxibenzoicos, flavonas, flavanonas e isoflavonas. Heiras-Palazuelos y col (2013) reportaron un rango de valores ORAC de 5011 a 5756 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra (bs) en cinco genotipos de garbanzo tipo desi cultivados en el estado de Sinaloa, demostrando el potencial que tienen estos materiales como fuente de mejora de la AA. Los autores también encontraron que esta actividad presentó una alta correlación positiva con el contenido de compuestos fenólicos totales.

En garbanzo también se han reportado otros fitoquímicos que presentan AA como fitosterol y tocoferol. Kalogeropoulos y col (2010) reportaron un buen contenido de fitoesterol (48.9 mg/100 g) que ofrece protección contra la oxidación de LDL y los sugieren como componentes dietarios importantes para mantener una buena salud cardíaca; los autores también registraron el contenido de tocoferoles (1.78 mg/100 g), los cuales son considerados como los antioxidantes lipídicos más efectivos ya que previenen la oxidación lipídica actuando como secuestradores de radicales peróxido.

Además de las propiedades antioxidantes presentadas por un gran número de fitoquímicos, también se ha reportado la presencia de péptidos con AA en leguminosas como soya y garbanzo (Moure y col, 2006; Kou y col, 2013). Dentro de las propiedades antioxidantes asociadas a estos péptidos se incluyen su habilidad para inactivar especies reactivas de oxígeno, secuestrar radicales libres, además de la posibilidad de impedir la penetración de iniciadores de la oxidación de lípidos por la formación de una capa protectora alrededor de las moléculas de lípidos (Moure y col, 2006; Zhu y col, 2008). Estas actividades dependen en gran medida de la

secuencia de aminoácidos que presenta el péptido; por ejemplo, los péptidos que contienen residuos de histidina tienen propiedades antioxidantes que les permiten quelar iones metálicos, inactivar especies reactivas de oxígeno y secuestrar radicales libres (Chen y col, 1998).

En general, todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres de alta energía. Entre los aminoácidos más reactivos se incluyen los azufrados metionina y cisteína, los aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, y los que contienen anillo imidazol como la histidina. Sin embargo, los aminoácidos individuales son antioxidantes poco efectivos en alimentos o sistemas biológicos; por lo tanto, es importante cuidar que no exista una proteólisis extensiva de proteínas alimentarias, ya que podría resultar en una disminución de la AA (Sarmadi y Ismail, 2010). En este contexto, la secuencia de aminoácidos de un péptido le confiere propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas. La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes alimentarias presentan intervalos de peso molecular de 5 a 18 kDa; asimismo, frecuentemente incluyen residuos de aminoácidos hidrofóbicos como valina o leucina en el amino terminal, así como prolina, histidina, triptófano, tirosina, metionina y cisteína en sus secuencias.

Megías y col (2007) evaluaron la inhibición de la oxidación de β -caroteno en presencia de cobre de dos fracciones de hidrolizados proteínicos y péptidos purificados de garbanzo generados con alcalasa y alcalasa-flavourzima. Los péptidos purificados fueron mejores inhibidores de la oxidación que los hidrolizados proteínicos, lo cual se atribuyó a una mayor proporción de residuos de histidina en los péptidos. Sin embargo, también se sugirió que el tamaño y secuencia de los péptidos tiene mucha influencia en la actividad, ya que a pesar de que el número de residuos de histidina fue mayor en los péptidos generados con alcalasa-flavourzima, la mayor actividad la presentaron los péptidos obtenidos solo con la enzima alcalasa. Por otro lado, Kou y col (2013) evaluaron la AA por DPPH de hidrolizados de albúmina de garbanzo (porcentajes de inhibición de 23-43%) y demuestran su potencial. Recientemente, Serrano-Sandoval y col (2019) evaluaron la actividad antioxidante celular de glutelinas y albúminas de garbanzo germinado en presencia de selenio; los autores demuestran un incremento en la actividad antioxidante y un

efecto protector en células Caco-2 de las proteínas selenizadas después de ser hidrolizadas con pepsina-pancretina, el mejor efecto protector sobre células Caco-2 se registró para los hidrolizados de glutelinas selenizadas.

4 Actividad anticancerígena

El cáncer es uno de los problemas de salud más importantes y su desarrollo se relaciona tanto con factores genéticos como ambientales (dieta, estilo de vida, fumar, exposición prolongada al sol y a residuos tóxicos); alrededor del 35% de los casos de cáncer se han asociado con la dieta (Doll, 1992; Benigni, 2005). En la evolución del cáncer, un evento clave es la ocurrencia de mutaciones en el ADN y la modulación de la mutagenicidad que puede alterar el efecto de compuestos genotóxicos, por lo que se ha incrementado el interés sobre la actividad de las sustancias antimutagénicas presentes en los alimentos (Rodríguez-Munoz y col, 2009).

Las plantas o alimentos de origen vegetal representan la principal fuente de metabolitos con actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas y varios estudios han mostrado una relación entre estas actividades y la AA (Johnson, 2003; Rocha-Guzmán y col, 2007).

Knekt y col (1997) observaron una relación inversa entre el consumo de flavonoides y la incidencia de cáncer de pulmón, efecto que fue atribuido principalmente a la quercetina. La quercetina es uno de los compuestos fenólicos que es muy eficiente en la eliminación de radicales libres (Liu y col, 2010). Los flavonoides modulan vías de transducción de señales implicadas en la expresión génica, la progresión del ciclo celular, la proliferación, el metabolismo y apoptosis (Ramos, 2008).

Otro fenólico de interés es el kaemferol, éste se distribuye ampliamente en los alimentos de origen vegetal y en particular en garbanzo (Mekky y col, 2015; Quintero-Soto, 2015; Quintero-Soto y col, 2018). Se ha demostrado que el consumo de kaemferol reduce drásticamente y de manera significativa el riesgo de contraer cáncer de ovario (Gates y col, 2007), por lo que este flavonoide podría ser un agente prometedor en quimioprevención. Sin embargo, los efectos directos de kaemferol en las células de cáncer de ovario son todavía desconocidos.

Garzón-Tiznado y col (2013) demostraron la actividad antimutagénica de tres genotipos de garbanzo tipo desi en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* (% inhibición = 57.8-62.3%); esta actividad correlacionó positivamente con el contenido de fenólicos totales y AA y sugieren la importancia de los fenólicos en la prevención/tratamiento del cáncer. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar los mecanismos involucrados en estos efectos. Chen y col (2015) evaluaron el efecto quimiopreventivo de extractos de isoflavonas de garbanzo encontrando que inducen la apoptosis de células de cáncer de mama, lo que sugiere su uso como tratamientos quimiopreventivos y quimioterapéuticos.

Actualmente, el efecto anticancerígeno de péptidos derivados de fuentes naturales ha tomado relevancia. Los péptidos tienen una alta afinidad y especificidad por blancos terapéuticos, baja toxicidad y biodisponibilidad (Bhutia y Maiti, 2008). Xue y col (2015) demostraron el efecto antiproliferativo del péptido ARG-GLN-SER-HIS-PHE-ALA-ASN-ALA-GLN-PRO, derivado de la fracción de albúminas de garbanzo, en células de cáncer de mama MCF-7; que el péptido sintético inhibió la proliferación de células MDA-MB-231; y que incrementó en la concentración de la proteína apoptótica p53, lo cual fue atribuido a la unión del péptido con el dominio de unión al ADN de la proteína p53, lo que impide su degradación o mutación.

Recientemente, Gupta y col (2019) purificaron de garbanzo silvestre una proteína tipo lectina y evaluaron su efecto sobre líneas celulares cancerígenas de humano (HepG2, Ishikawa, MCF-7 y MDA-MB-231); el peso molecular de la lectina fue inferior al péptido lunasina que tiene propiedades anticancerígenas. La lectina purificada mostró una disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular, efectos protectores sobre el ADN, actividad antifúngica y antibacteriana. Sin embargo, no se detallaron los mecanismos de acción de esta proteína sobre las actividades evaluadas.

5 Actividad antidiabética

La diabetes mellitus tipo 2 es un trastorno metabólico caracterizado tanto por defectos progresivos en los secretores de insulina, así como por resistencia periférica a esta misma, lo que conduce a hiperglucemia crónica y alteraciones del

metabolismo. La alta incidencia de diabetes se atribuye a cambios en el estilo de vida, el consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos y la vida sedentaria que conduce a la obesidad (Ardisson Korat y col, 2014). La diabetes se controla disminuyendo la hiperglucemia posprandial y una forma de lograrlo es mediante el control o retraso de la absorción de glucosa en el intestino delgado (Campbell y Rains, 2014). Esto se puede lograr mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa o α -glucosidasa, las cuales hidrolizan polisacáridos durante la digestión. El almidón presente en los alimentos, junto con otros polisacáridos, son hidrolizados por la enzima α -amilasa a otros oligosacáridos; estos oligosacáridos son sustrato de la α -glucosidasa que libera los monosacáridos que son absorbidos (Kim y col, 2014).

La α -amilasa está formada por tres dominios (A, B y C); la triada catalítica de esta enzima se encuentra en el dominio A (ASP¹⁹⁷, GLU²³³ y ASP³⁰⁰) (Brayer y col, 1995). El ASP¹⁹⁷ es un nucleófilo que ataca al carbono anomérico del sustrato y forma un enlace covalente, separando al extremo reductor del almidón, después una molécula de agua ataca el centro anomérico para romper el enlace covalente entre ASP¹⁹⁷ y el sustrato, uniendo un grupo hidroxilo al centro anomérico; durante esta reacción, GLU²³³ y ASP³⁰⁰ actúan como catalizadores ácido/base, ya sea juntos o por separado (Brayer y col, 2000).

La α -glucosidasa humana es lisosomal y consta de varios dominios: N-terminal tipo-P, lamina β , β/α que tiene dos inserciones después de la cadena β ($\beta 3$ y $\beta 4$), y dos dominios lamina β cerca y lejos del extremo C-Terminal. El sitio activo de la enzima está ubicado en el extremo C-terminal de la cadena β del dominio catalítico β/α donde se forma un bucle entre la cadena β y los insertos $\beta 3$ y $\beta 4$ (Roig-Zamboni y col, 2017). El sitio activo presenta residuos hidrofóbicos e hidrofílicos que estabilizan al sustrato principalmente mediante interacciones hidrofóbicas (Ur Rehman y col, 2019). La α -glucosidasa tiene un mecanismo de reacción clásico de doble desplazamiento de Koshland mediante la unión por puentes de hidrógeno del carbono anomérico del sustrato y el residuo ASP⁵¹⁸, mientras que los residuos GLU⁵²¹ y ASP⁶¹⁶ actúan como donadores de protones estabilizando el estado de transición del sustrato en conjunto con ARG⁶⁰⁰ e HIS⁶⁷⁴ (Hermans y col, 1991; Roig-Zamboni y col, 2017; Ur Rehman y col, 2019).

Otra manera de controlar la diabetes es mediante la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP4); DPP4 degrada el péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP); GLP-1 y GIP son responsables de estimular la secreción de insulina (Patel y Ghate, 2014). La DPP4 es una serín proteasa que hidroliza péptidos y proteínas en el extremo N-terminal de prolina, hidroxiprolina, deshidroprolina o alanina (Rahfeld y col, 1991). La DPP4 consta de tres regiones principales: cola citoplasmática (aminoácidos 1-6), región transmembranal (7-8) y una parte extracelular (29-766). A su vez, la región extracelular tiene dos dominios: el primero contiene la triada catalítica (SER⁶³⁰, ASP⁷⁰⁸/ASN⁷¹⁰ y HIS⁷⁴⁰) y un pliegue α/β -hidrolasa (508-766); y el segundo presenta una cadena de ocho hélices β (56-497) que también forman parte del sitio de unión a sustrato (Patel y Ghate, 2014). La DPP4 tiene dos sitios de unión: el sitio 1 (S1) está formado por aminoácidos hidrofóbicos (TYR⁵⁴⁷, TYR⁶³¹, VAL⁶⁵⁶, TRP⁶⁵⁹, TYR⁶⁶², TYR⁶⁶⁶ y VAL⁷¹¹) que permiten que los aminoácidos no cargados interactúen con la triada catalítica; y el sitio 2 (S2) involucra interacciones claves con GLU²⁰⁵, GLU²⁰⁶ y ARG¹²⁵, está formado por una cadena hidrofóbica larga y una cadena aromática que incrementan la afinidad por los sustratos. Además, DPP4 presenta una cavidad más grande que está rodeada por VAL²⁰⁷, SER²⁰⁹, ARG³⁵⁸ y PHE³⁵⁷ y forman el subsitio S2' (De y col, 2019).

La obtención de compuestos o péptidos que interactúen con los aminoácidos catalíticos de las enzimas es una buena manera de disminuir su actividad. Los agentes antidiabéticos actualmente disponibles (sulfonilureas, biguanidas, diprotina A, sitagliptina e inhibidores de α -glucosidasa y α -amilasa, entre otros) tienen un uso limitado debido a efectos secundarios indeseables y altas tasas de fracaso (Kasetti y col, 2010). En este sentido, los alimentos de origen vegetal con propiedades antidiabéticas pueden proporcionar una fuente útil para el desarrollo de agentes hipoglucemiantes orales más seguros y eficaces. La actividad hipoglucemiante de un número de plantas y productos vegetales ha sido evaluada y confirmada en modelos animales, así como en seres humanos (Kasetti y col, 2010; Sunil y col, 2012).

Las leguminosas contienen lectinas que originalmente fueron consideradas como agentes antinutricionales y que debían desnaturalizarse por tratamiento térmico

antes del consumo humano. Sin embargo, existe evidencia científica que sugiere que las lectinas pueden jugar un papel clave en la prevención de ciertos tipos de cáncer y ser utilizadas como agentes terapéuticos para prevenir o controlar la diabetes (Wang y col, 2000; González De Mejía y Prisecaru, 2005; Pryme y col, 2006; Hartmann y Meisel, 2007). El uso potencial de las lectinas de leguminosas como un nutraceutico para el control de la diabetes se puede atribuir a su capacidad de aglomerar carbohidratos, disminuyendo la absorción en el torrente sanguíneo y por su capacidad para resistir la digestión gástrica sin dejar de ser biológicamente activa (Roy y col, 2010).

Algunos fitoquímicos de leguminosas también poseen actividad antidiabética, entre ellos las isoflavonas de garbanzo con actividad hipoglucémica (Li y col, 2007). La genisteína de garbanzo disminuyó significativamente los niveles de insulina en suero, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja y alta densidad y aumentó la tolerancia a la glucosa en ratas con diabetes tipo 2 (Wei y col, 2017). Este compuesto puede utilizarse para tratar la diabetes tipo 2 y estimular la liberación de insulina en el caso de la diabetes tipo 1 (Haneishi y col, 2011). Li y col (2015) sintetizaron isoflavonas derivados de genisteína y demostraron su actividad hipoglucémica en el modelo celular HepG2 resistente a insulina; algunos derivados mostraron mayor actividad que los precursores y también registraron efectos aditivos/sinérgicos, sugieren que estos efectos se debe a que actúan sobre diferentes blancos en el organismo.

El potencial antidiabético de las leguminosas esta dado también por péptidos bioactivos presentes en hidrolizados proteínicos, tal es el caso de los péptidos reportados por Oseguera-Toledo y col (2015), Mojica y col (2015), de Souza Rocha y col (2015), Oseguera Toledo y col (2016) y Mojica y col (2017) en diferentes variedades de frijol. Estos estudios sugieren que las fracciones de proteínas de leguminosas pueden ser una fuente alternativa de péptidos bioactivos para ser utilizados como ingredientes nutraceuticos en las dietas de pacientes con diabetes. No se encontraron reportes donde se identifiquen péptidos con esta actividad en garbanzo, por lo que es importante caracterizar hidrolizados proteínicos de esta leguminosa para conocer si son una fuente de este tipo de péptidos.

D DIVERSIDAD GENÉTICA Y MEJORAMIENTO DE GARBANZO

Desde hace décadas se han implementado programas de mejoramiento de garbanzo con el objetivo de crear variedades con mayor productividad y buena estabilidad, semillas grandes y de alta calidad, resistencia al estrés abiótico y biótico, y una estructura de planta adaptada para la recolección mecánica (Singh, 1990). Dicho potencial solo puede realizarse plenamente si se cuenta con una diversidad de materiales genéticos que permita seleccionar o mejorar características específicas. Por tal razón, se han realizado esfuerzos en las principales regiones productoras del mundo, entre ellas el estado de Sinaloa a través del Instituto Nacional de Investigadores Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), para identificar fuentes de resistencia y transferirla a variedades de interés comercial mediante mejoramiento clásico.

Las primeras variedades mejoradas de garbanzo blanco tipo kabuli para el Noroeste de México obtenidas por selección individual fueron Unión, Angostura, Culiacán 860 y Sinaloa. Durante las décadas de 1970 y 1980 se obtuvieron otras variedades como Surutato 77, Sonora 80 y Santo Domingo 82, las cuales presentaban además de mejor rendimiento y calidad, resistencia al ataque de *Fusarium*, misma que se introdujo de garbanzo tipo forrajero. Con el trabajo de INIFAP se han ido liberando variedades como Tubatama 88, Mocerito 88, Blanco Sinaloa 92, Hermosillo 93, Pitic 93, Costa 2004, Suprema 03, Jumbo 2010 y Blanoro. Las variedades desarrolladas en México presentan características que le han permitido constituirse en cultivos; algunas de ellas se muestran en el Cuadro 8.

En lo referente al desarrollo de nuevas variedades, el uso de marcadores moleculares como parte de un programa de selección asistida es de gran utilidad para complementar la selección en campo que actualmente se realiza por instituciones como el INIFAP. Además, el desarrollo de estos materiales se ha basado solo en criterios agronómicos, dejando de lado características funcionales, nutricionales y nutracéuticas del grano de garbanzo, por lo cual existe la necesidad de generar variedades que además de ser resistentes a enfermedades y posean buen tamaño de grano, también cuenten con características alimentarias adecuadas

Cuadro 8. Variedades de garbanzo desarrolladas en México

Variedad	Pedigrí	Características	Referencia
Surutato 77	(L-1186 x Macarena) x Macarena	Resistencia a la rabia y hongos del género <i>Fusarium</i>	López García y Andrade Arias (1979)
Santo Domingo 82	(L-41 x Breve Blanco) x Breve Blanco	Resistencia a rabia	Gómez Garza (1983)
Mocorito 88	558 x Surutato 77	Resistencia a rabia	Gómez-Garza (1990)
Blanco Sinaloa 92	Santo Domingo 82 x Blanco Lechoso	Resistencia a la rabia, gran calibre, resistencia a hongos del genero <i>Fusarium</i>	Gómez-Garza y col (2003a)
Pitic 93	(L-1794 x Macarena) x L1855-Sur	Resistencia a la rabia, gran calibre, rendimiento alto	Morales-Gómez y García (1993)
Progreso 95	Santo Domingo 82 x ILC-72	Porte erecto, alto rendimiento, grano pequeño	Gómez-Garza y Salinas-Pérez (2001b)
Jamu 96	(Santo Domingo 82 x ILC72) x (Santo Domingo 82 x Blanco Lechoso)	Hábito erecto	Gómez-Garza y Salinas-Pérez (2001a)
Tequi Blanco 98	(L-4294 x Hermosillo) x Blanco Lechoso	Resistencia a la rabia, gran calibre, ciclo tardío	Morales-Gómez (1999)
Desierto 98	(L-4294 x Hermosillo) x Blanco Lechoso	Resistencia a la rabia	Morales-Gómez (1999)
Suprema 03	Blanco Sinaloa 92 x Blanco Sinaloa 92	Resistencia a la rabia, gran calibre	Gómez-Garza y col (2003b)
Costa 2004	Tubutama 88 x Blanco Sinaloa 92	---	Morales Gómez y col (2005)
Jumbo 2010	Dwelley x Blanco Sinaloa 92	Resistencia a la rabia, resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>Ciceris</i> , gran calibre, rendimiento medio	Valenzuela-Herrera y col (2016)

para darle mayor valor agregado a la producción y mejorar su competitividad en los mercados de exportación (Manjarrez y col, 2004).

La mayoría de las investigaciones en garbanzo se han enfocado hacia la búsqueda y desarrollo de marcadores moleculares asociados con estreses biótico y abiótico, destacando en primer lugar los esfuerzos para descubrir y caracterizar un gran número de microsatélites (Sethy y col, 2006; Varshney y col, 2007). El polimorfismo encontrado con estos marcadores ha permitido el desarrollo de mapas genéticos para la identificación de loci asociados con algunos caracteres de interés agronómico (Abbo y col, 2003), destacando la enfermedad de la rabia causada por el hongo *Fusarium* (Sharma y Muehlbauer, 2007).

Existen pocos reportes en la literatura relacionados con la identificación de loci o marcadores asociados con características de calidad del grano en garbanzo. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Abbo y col (2005), quienes realizaron un mapeo genético en una población derivada de la cruce entre los genotipos de garbanzo Cr205 (silvestre) y Hadas (kabuli), identificando cuatro QTL asociados con el contenido de luteína, uno con β -caroteno y tres con el peso de 100 granos. Saeed y col (2013) identificaron 11 SSR asociados a características agronómicas (susceptibilidad a la plaga *Ascochyta*, tolerancia al frío, peso de 100 granos y rendimiento), destacando el marcador TS84 que se encontró asociado con la mayoría de las características evaluadas. Recientemente, Jadhav y col (2015) analizaron la variación en el contenido de proteína cruda en 30 genotipos de garbanzo y la relacionaron con el genotipo de 23 SSR; se identificaron 19 microsatélites asociados al contenido de proteína distribuidos en los grupos de ligamiento LG1, LG2, LG3, LG4 y LG5, demostrando el uso potencial de estos marcadores para el mejoramiento de garbanzo.

En lo que respecta a los materiales de garbanzo del noroeste de México, nuestro grupo de investigación ha iniciado la caracterización molecular de algunos de estos genotipos con microsatélites en la idea de apoyar los esfuerzos realizados por el programa de mejoramiento genético del INIFAP (Chavez-Ontiveros y col, 2020). Dentro de los principales resultados se puede destacar el alto número de alelos por locus (5.3) y un alto valor de diversidad genética total (0.72), demostrando una

amplia variabilidad genética en los materiales de garbanzo estudiados. En la Fig. 8 se muestra un dendograma con la distancia genética de los materiales estimada por microsatélites. De manera general, los 23 genotipos de garbanzo analizados se integraron en dos grupos principales: tipo desi y tipo kabuli. En el caso del garbanzo tipo desi, los genotipos ICC3761 e ICC4418, dos genotipos de color negro originarios de Irán, formaron el primer grupo con menor distancia genética. En el caso del garbanzo tipo kabuli, los genotipos que mostraron la menor distancia genética fueron Santo Domino 82 y Evora 98, donde este último es el resultado de una cruce entre Surutato 77 y Santo Domingo 82, dos genotipos que representan la base genética de diversos genotipos kabuli desarrollados en México.

E PROTEÓMICA EN LEGUMINOSAS

La proteómica involucra la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales (Anderson y Anderson, 1998). En este sentido, la proteómica separa, identifica y caracteriza proteínas a gran escala, define niveles de proteínas celularmente, investiga complejos de proteínas, elucida funciones, rutas metabólicas e interrelaciones (Kenyon y col, 2002). El análisis del proteoma tiene muchas ventajas con respecto a la sola enumeración de los genes, ya que la expresión de los mismos dependerá del tipo celular y de los estímulos del medio. Aunado a ello, la regulación de los eventos celulares puede ocurrir a nivel de proteínas sin aparente cambio en la abundancia de ARNm, principalmente por la presencia de modificaciones post-traduccionales (Rose y col, 2004).

La proteómica es relativamente nueva y se estableció sobre la base de técnicas analíticas conocidas como la electroforesis y la espectrometría de masas (Humphery-Smith y col, 1997). La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) separa las proteínas por medio de dos parámetros fisicoquímicos. La primera dimensión, conocida también como isoelectroenfoco, separa las proteínas a través de un gradiente de pH inmovilizado; las proteínas migran hasta el punto en el cual su carga es cero (punto isoelectro, pI).

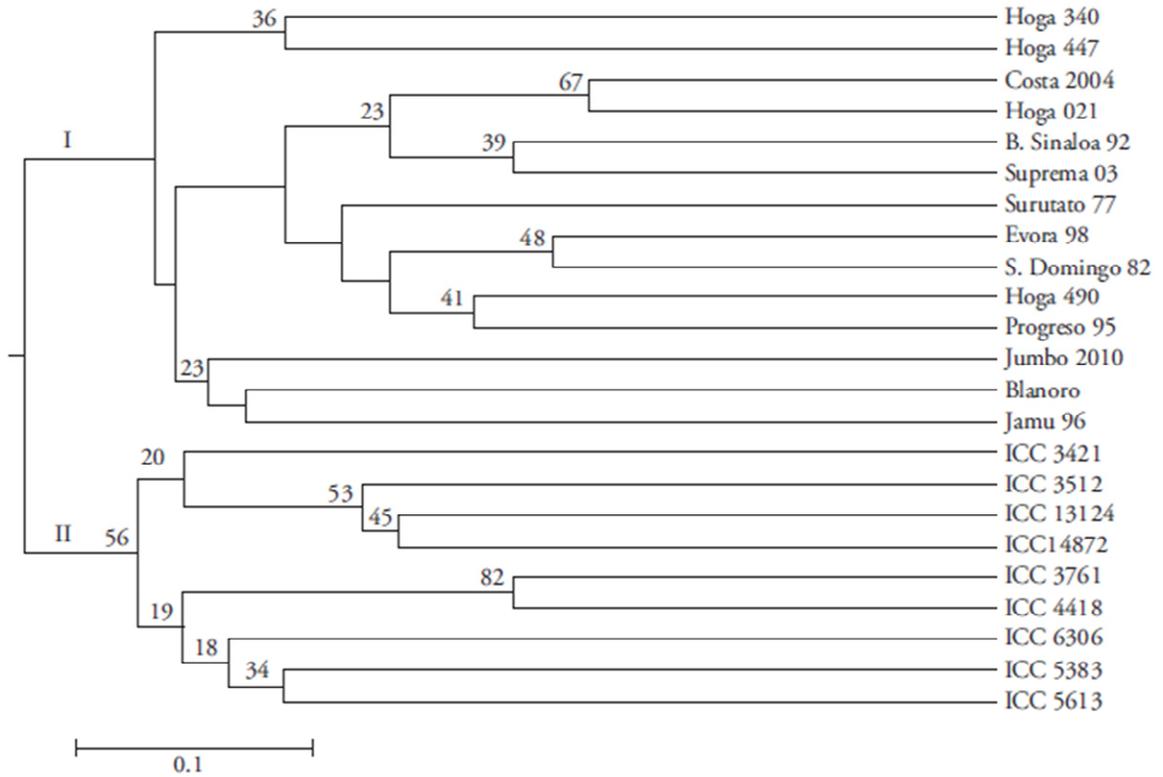


Fig 8. Relaciones genéticas entre 23 genotipos de garbanzo de México y del ICRISAT. Dendrograma obtenido con el método UPGMA basado en la distancia de Nei y col (1983). Los grupos I y II corresponden a los genotipos Kabuli y Desi, respectivamente.

Chavez-Ontiveros y col (2020)

La segunda dimensión separa las proteínas en función de su masa molecular utilizando un agente tensoactivo, como dodecil sulfato de sodio (SDS), que se une a la proteína para proporcionar una relación uniforme entre la carga y la masa, lo que permite que las proteínas se separen de acuerdo a su masa (Herbert y col, 1997; Gorg y col, 2004).

La principal aplicación de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión. En este sentido, la acumulación de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa. La aparición o desaparición de manchas proporciona información sobre la acumulación diferencial de proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de acumulación (Gil, 2003). Posteriormente, las manchas son identificadas mediante espectrometría de masas. Algunas de las etapas críticas en 2D-PAGE son la preparación de la muestra y la solubilización de las proteínas, así como obtener un buen enfoque de estas. Posteriormente, las proteínas se visualizan por tinción con azul de Coomassie o plata; sin embargo este último método de tinción no es compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) (Patton, 2000), ya que fija las proteínas en el gel, evitando su digestión y la recuperación de algunos péptidos formados.

Para la identificación de las proteínas de interés, una vez analizadas las diferencias cuali y cuantitativas mediante programas computacionales, la proteína es removida del gel y digerida con una proteasa, usualmente tripsina. La mezcla de péptidos se lava para eliminar las sales y se resuspende en un solvente adecuado para su análisis posterior por espectrometría de masas (Gorg y col, 2004).

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado (Yates, 2000). La espectrometría de masas puede llevarse a cabo en una sola etapa (MS) o en tándem (MS/MS). El primer paso de la MS en tándem involucra la ionización de la muestra y la separación basada en la relación masa-carga de los iones primarios; enseguida se selecciona un ión con un valor de masa-carga específica y es fragmentado, los iones fragmentados detectados después pasan a través de un segundo espectrómetro de masas (Fig. 9).

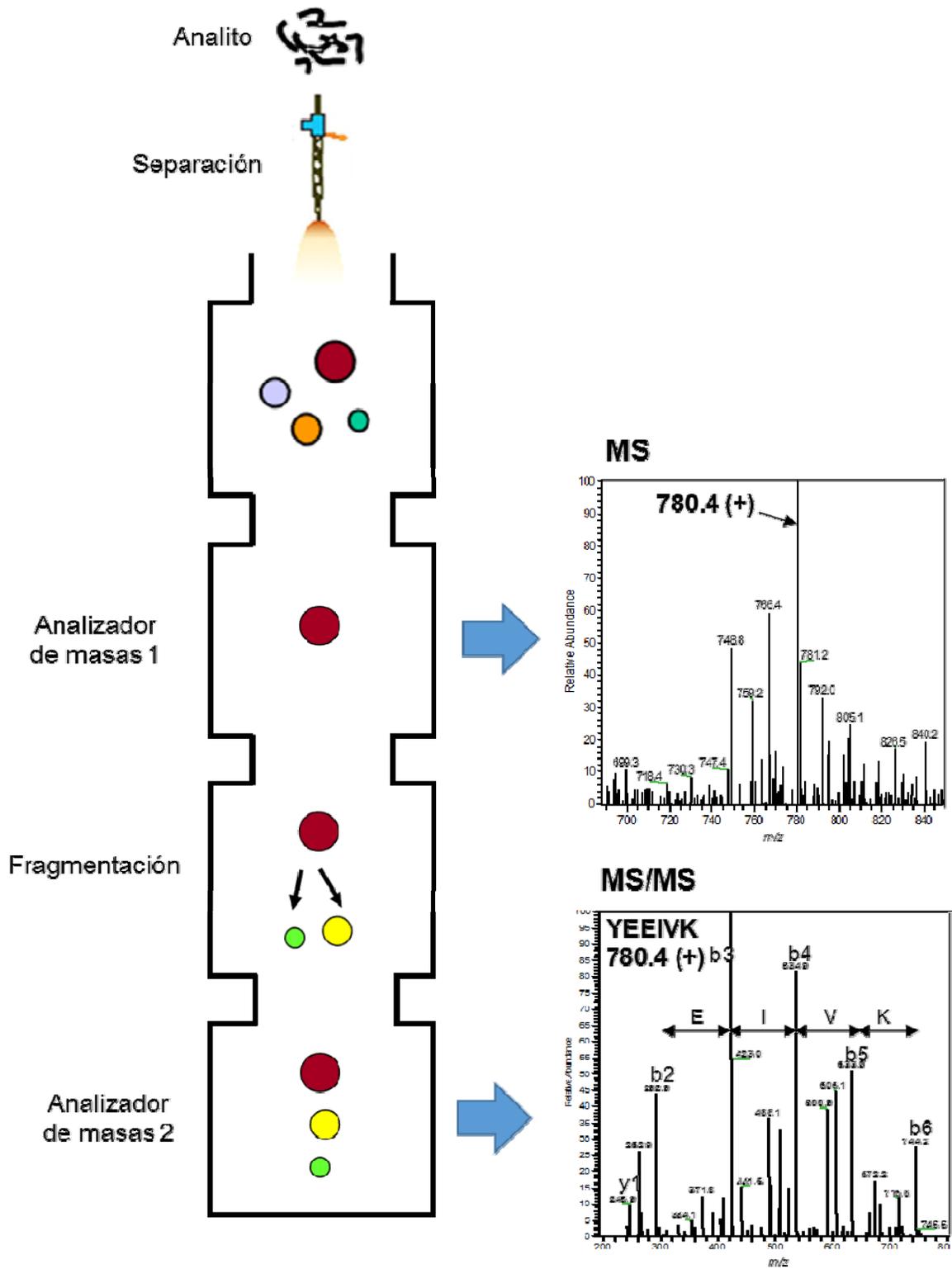


Fig 9. Espectrometría de masas en tándem.

Este proceso produce una serie de iones fragmentados que pueden diferir en un solo aminoácido/compuesto, permitiendo obtener una porción de la identidad del analito para ser determinada y usada para la búsqueda en base de datos.

Cuando un analito ha sido identificado, el patrón de fragmentación teórico puede ser predicho y comparado con lo observado en el espectro MS/MS por asignación de otros picos que puedan validar la identificación. Este proceso puede repetirse para cada uno de los analitos fragmentados de la muestra (Rose y col, 2004).

En años recientes, esta tecnología ha permitido determinar la identidad y función de un gran número de proteínas de leguminosas. Sin embargo, a pesar de la importancia económica del garbanzo y de su contribución en la nutrición de los seres humanos, los reportes que realicen proteómica de garbanzo son escasos; los estudios existentes se han enfocado principalmente en la identificación de proteínas de garbanzo relacionadas con condiciones de estrés biótico/abiótico.

Chang y col (2011) caracterizaron las fracciones de albúminas y globulinas de proteínas del grano de garbanzo mediante un análisis proteómico basado en la combinación de 1D-PAGE y LC-MS/MS; en las globulinas, identificaron las fracciones 11S y 7S y dieciocho péptidos que tienen homología con las subunidades α y β de legumina de garbanzo; por otro lado, en la fracción albúmina se identificaron dieciséis péptidos como precursores de provicilina. El estudio proteómico de garbanzo de Jaiswal y col (2012) identificó por MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-MS/MS 91 proteínas involucradas en diversas funciones celulares (*e.g.*, energética, metabolismo, síntesis y degradación de proteínas), registrando que el 70% de las proteínas identificadas presentan dominios transmembranales y posiblemente sean proteínas integrales de membrana. Bar-El Dadon y col (2013) analizaron la fracción de globulinas de garbanzo, encontrando una subunidad de 20 kDa correspondiente a una vicilina 7S, cuya secuencia mostro similitud con la proteína glicinina de soya la cual ya había sido reportada anteriormente por otros investigadores como alérgeno.

Heidarvand y Maali-Amiri (2013) estudiaron las proteínas expresadas durante situaciones de estrés por frío en garbanzo, observando cambios en las enzimas del sistema antioxidante, con una mayor acumulación de la enzima ascorbato peroxidasa. Estos investigadores sugieren que esta enzima podría ser considerada

como un biomarcador de la tolerancia al frío. Por otro lado, Singh y col (2016) realizaron un estudio de proteómica comparativa entre una línea no domesticada de garbanzo y una cultivada. El análisis por 2D-PAGE reveló solo seis proteínas expresadas diferencialmente, lo cual se puede atribuir a que los autores utilizaron un rango amplio de punto isoelectrico (3-10). La identificación de estas proteínas por MALDI-TOF-MS reveló que en su mayoría pertenecen a proteínas de almacenamiento tipo leguminas.

Uno de los principales problemas que afectan la planta de garbanzo es el estrés por sequía. Gupta y col (2020) estudiaron las proteínas acumuladas en la raíz de garbanzo durante condiciones de sequía. Dicho análisis permitió la identificación de 74 proteínas expresadas diferencialmente utilizando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS); estas proteínas están involucradas en distintos procesos biológicos como el metabolismo de carbohidratos y lípidos (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, transaldolasa e isocitrato deshidrogenasa), metabolismo de proteínas (adenosina quinasa 2 y proteínas disulfuro-isomerasa), sistema antioxidante (glutación S-transferasa, ascorbato peroxidasa y tiorredoxina), transducción de señales (actina-101 y proteína B similar a 14-3-3), metabolismo secundario (cinamoil-CoA reductasa-1 y chalcona-flavonona isomerasa 2), metabolismo de nitrógeno (glutamina sintetasa y homocisteína metiltransferasa) y respuesta a estrés (proteína de choque térmico, proteína de dominio CS y similares a la quitinasa 2).

Sin embargo, a la fecha no se ha reportado un análisis de la variabilidad en la acumulación de proteínas en genotipos de garbanzo de México que pueda ser relacionada con la diversidad genética presente en estos materiales. Además, el conocer la identidad de proteínas acumuladas diferencialmente entre estos genotipos pudiera ayudar a explicar las variaciones encontradas en sus propiedades nutrimentales y nutraceuticas.

F PEPTIDÓMICA EN LEGUMINOSAS

Los péptidos y proteínas son uno de los principales componentes de los alimentos de origen animal y vegetal. Los péptidos son obtenidos por hidrólisis de las

proteínas mediante el uso de métodos químicos o físicos (Martínez-Maqueda y col, 2013). Un esquema básico de trabajo en la peptidómica incluye la extracción de las proteínas de interés, limpieza y/o purificación del extracto proteínico, hidrólisis enzimática o tecnológica de las proteínas, purificación de fracciones peptídicas o péptidos puros e identificación de los péptidos por espectrometría de masas (Minkiewicz y col, 2008a).

Existe una gran variedad de herramientas de extracción y purificación de péptidos en función de sus características fisicoquímicas y estructurales, como la solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular, punto isoeléctrico, entre otros; se utilizan diferentes agentes proteolíticos para la digestión de las proteínas, incluidas enzimas como la tripsina o quimotripsina, así como reactivos químicos como la hidroxilamina o el bromuro de cianógeno (Martínez-Maqueda y col, 2013). La especificidad del enlace amida o los enlaces escindidos por estos reactivos permite la obtención de péptidos específicos que facilitan la interpretación de sus espectros de masas y la búsqueda en las base de datos (Minkiewicz y col, 2008a).

En la práctica es difícil analizar péptidos alimenticios debido a la presencia de compuestos indeseados como lípidos, ácidos nucleicos y azúcares; es por eso que se requieren pasos extras de purificación. La cromatografía líquida de fase reversa y la electroforesis capilar son métodos básicos utilizados en el análisis del peptidoma de alimentos (Poliwoda y Wieczorek, 2008).

Kou y col (2013) purificaron péptidos de la fracción de albúminas mediante cromatografía de exclusión por tamaño y espectrometría de masas; las fracciones obtenidas presentaron buena capacidad de inhibición de los radicales ABTS y DPPH, principalmente la fracción CPe-III (Arg-Gln-Ser-His-Phe-Ala-Asn-Ala-Gln-Pro), la cual también inhibió la proliferación de células de cáncer de mama y redujo los niveles de colesterol total y triglicéridos de ratones hiperlipidémicos (Xue y col, 2015; Xue y col, 2018).

Torres-Fuentes y col (2015) purificaron péptidos a partir de proteínas de garbanzo; los péptidos se obtuvieron por hidrólisis con pepsina y pancreatina y purificados mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando cobre inmovilizado como ligando, y cromatografía de exclusión por tamaño; la

espectrometría de masas mostró que los péptidos forman parte de la proteína legumina A; a demás, observaron que los péptidos tienen la capacidad de eliminar radicales libres y generaban un efecto protector sobre células Caco-2 expuestas a agentes oxidantes.

Recientemente, Milan-Noris y col (2018) analizaron, por cromatografía en fase reversa preparativa y espectrometría de masas, hidrolizados proteínicos de germinados de un garbanzo tipo desi y uno kabuli (Blanco Sinaloa 92); los hidrolizados se obtuvieron por simulación gastrointestinal; los autores reportaron un total de 24 péptidos candidatos para la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados. Sin embargo, se requiere purificar y evaluar dichos péptidos individualmente para encontrar los responsables de dicha actividad.

A pesar de lo anterior, existen pocos estudios donde los péptidos de garbanzo se purifiquen, secuencien y determine su contribución a las diversas actividades biológicas asociadas a los hidrolizados proteínicos; en particular, son escasos los estudios sobre péptidos provenientes de los genotipos de garbanzo de interés para el programa de mejoramiento de INIFAP en México.

G METABOLÓMICA DE LEGUMINOSAS

La metabolómica es la rama de la bioquímica analítica que se encarga de clasificar y cuantificar moléculas presentes en los sistemas biológicos conocidas como metabolitos (Nagana Gowda y col, 2017). Se refiere al estudio de perfiles metabólicos asociados a diversas condiciones bioquímicas o ambientales. El metabolismo primario hace referencia a moléculas que son indispensables para el desarrollo de la planta (*e.g.*, proteínas, lípidos, vitaminas, azúcares), mientras que el metabolismo secundario estudia aquellas moléculas de bajo peso molecular que son sintetizadas por las plantas pero no son indispensables para su sobrevivencia.

Uno de los enfoques de la metabolómica es el desarrollo y descubrimiento de biomarcadores alimenticios y nutricionales importantes para conocer las posibles relaciones entre enfermedades y dieta, así como también mejorar el conocimiento acerca de los componentes alimentarios, micronutrientes y sus posibles efectos en

los organismos (Nagana Gowda y col, 2017). Actualmente se utilizan dos métodos complementarios en las investigaciones metabolómicas: huella metabólica y diseño de perfiles metabólicos. En el diseño de perfiles metabólicos, los métodos de análisis utilizados para medir metabolitos de una clase determinada son cuantitativos. En la huella metabólica se hacen comparaciones para determinar si los metabolitos han cambiado debido a la exposición a diversas condiciones. Para hacer este tipo de comparaciones se utilizan métodos semicuantitativos, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. Los datos generados suelen requerir de herramientas bioinformáticas.

Aguilera y col (2011b) investigaron el perfil de compuestos fenólicos de harinas de frijol variedad Cannellini y Pinto con ayuda de un HPLC con detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización ESI, identificando un total de 24 compuestos en frijol pinto y 18 en Cannellini, dentro de los cuales se encontraron ácidos hidroxicinámicos y benzoicos, catequinas, procianidinas, cumarinas y flavonoles. De los 24 compuestos identificados en frijol pinto, 13 fueron flavonoides y 11 ácidos fenólicos; mientras que en Cannellini solo 6 fueron flavonoides y el resto ácidos fenólicos (12). Stanisavljević y col (2015) identificaron metabolitos secundarios del tipo fenólico en testa de chícharo, identificando un total de 41 compuestos entre los que se encontraron el ácido rosmarínico, rutina, morina, naringeina y hesperetina.

En lo que respecta al garbanzo, Sreerama y col (2010) analizaron la composición de fenólicos en testa, cotiledón y eje embrionario utilizando cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), identificando tres flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina), dos isoflavonas (daidzeína y genisteína), cinco derivados de ácido benzoico (ácido gálico, ácido protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, vanillico y siríngico) y cinco derivados de ácido cinámico (ácido cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico). Quercetina, kaempferol y miricetina se encontraron distribuidos en toda la semilla, pero su contenido fue mayor en testa, mientras que los ácidos cinámicos fueron los principales constituyentes del cotiledón; también identificaron las antocianinas cianidina, delphinidina y petunidina en testa, pero no en el cotiledón.

Aguilera y col (2011a) determinaron el perfil de compuestos fenólicos en dos variedades de garbanzo, destacando Blanco Sinaloa 92 para el que identificaron 12 compuestos, principalmente isoflavonas como derivados de biocanina A y B, así como derivados de quercetina, kaempferol, ácido hidroxibenzoico y ácido *p*-cumárico. Fratianni y col (2014) identificaron por UPLC los compuestos fenólicos de dos variedades de garbanzo, Sassano y Calsevita; registrando ácido gálico, clorogénico, cafeico, cumárico, ferúlico, catequina, epicatequina, rutina, luteolina y quercetina, siendo catequina el compuesto más abundante en ambos materiales. Por otro lado, Magalhaes y col (2017) identificaron solamente ácidos fenólicos (*p*-hidroxibenzoico y gentísico) en cinco genotipos kabuli de Europa, mientras que en un genotipo desi adicionalmente reportaron derivados glucosilados de los flavonoides luteolina, miricetina y quercetina.

Uno de los estudios metabolómicos más completos en garbanzo fue realizado por Mekky y col (2015), quienes identificaron 96 compuestos fenólicos en cultivares de Egipto mediante RP-HPLC-DAD acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización ESI y analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (ESI-QTOF-MS). La gran diversidad de compuestos estuvo conformada en su mayoría por derivados de ácidos fenólicos y flavonoides. Los principales ácidos fenólicos fueron gálico, vaníllico, *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, así como algunos derivados glucosídicos. Los principales flavonoides fueron del tipo flavonoles (29) como rutina, isoramnetina, kaempferol y derivados de kaempferol y quercetina. También se detectaron 12 isoflavonas y 2 isoflavononas, tales como genisteina, biocanina A, orobol y dos isómeros de dalpanina.

Sin embargo, existen pocos reportes en los que se identifiquen los compuestos fenólicos presentes en los distintos genotipos de garbanzo y se evalúe la contribución de cada fenólico a la actividad biológica, por lo que es importante caracterizar el perfil de compuestos fenólicos y su contribución a la actividad antioxidante de genotipos de garbanzo tipo kabuli desarrollados por INIFAP y otros tipo desi de interés alimentario.

IV OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar los perfiles de compuestos fenólicos y péptidos de genotipos de garbanzo y su asociación con la actividad antioxidante y antidiabética del grano.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el perfil de compuestos fenólicos de extractos metanólicos en 18 genotipos de garbanzo de interés alimentario.
- 2) Caracterizar el perfil de globulinas y albuminas de los genotipos de garbanzo estudiados.
- 3) Evaluar la actividad antioxidante de extractos metanólicos e hidrolizados proteicos de los garbanzos estudiados.
- 4) Evaluar la actividad antioxidante y antidiabética de fracciones peptídicas purificadas a partir del genotipo de garbanzo más sobresaliente en cuanto a su actividad antioxidante y contenido de proteínas.
- 5) Caracterizar el perfil de péptidos de fracciones purificadas a partir del genotipo de garbanzo más sobresaliente.
- 6) Determinar asociaciones entre los compuestos fenólicos y péptidos con las actividades antioxidantes y antidiabéticas evaluadas en los genotipos de garbanzo seleccionados.

V MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizaron un total de 18 genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L), cuyo nombre y origen se indican en el Cuadro 9. Dentro de ellos se incluyen ocho genotipos tipo desi (Fig. 10) provenientes de la colección del Banco Mundial de Germoplasma del Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT), así como 10 genotipos tipo kabuli (Fig. 11), nueve facilitados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y uno por el ICRISAT. Estos materiales fueron cultivados bajo condiciones de riego en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) del INIFAP con la ayuda de la MC. Milagros Ramírez Soto.

B MÉTODOS

1 Caracterización del perfil de compuestos fenólicos

a Preparación de extractos metanólicos

Para determinar del perfil de compuestos fenólicos primeramente se prepararon extractos metanólicos siguiendo la metodología de Sreerama y col (2010) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 0.75 g de harina de garbanzo con 30 mL de metanol al 80 % (v/v), la mezcla se homogenizó por 30 min en un agitador orbital y posteriormente se sónico por 30 min. El extracto sonicado se hidrolizó con 12 mL de HCl 2M durante 30 min a 90 °C en baño María. Después de centrifugar (15,000 g, 20 min), el sobrenadante se mezcló con 30 mL de hexano, se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 50 mL de agua. Posteriormente se agregaron 30 mL de acetato de etilo, se recuperó la fase de acetato de etilo y se llevó a sequedad en un rotavapor. El residuo seco se resuspendió en 0.75 mL de metanol al 80% y se pasó por un filtro de 0.45 µm (PVDF membrana HPLC certified, Pall, USA). Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Cuadro 9. Genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) utilizados

Genotipo	Color de grano	País de origen	Pedigrí
Tipo Kabuli			
Surutato 77	Beige	México	(L-41 x Macarena) x Macarena ¹
Sto. Dom. 82	Beige	México	(L-41 x Breve Blanco) x Breve Blanco ²
Bco. Sin. 92	Beige	México	Sto. Dom. 82 x Blanco Lechoso ³
Progreso 95	Beige	México	Sto. Dom. 82 x ILC-72 ⁴
Suprema 03	Beige	México	Bco. Sin. 92 x Bco. Sin. 92 ⁵
Jumbo 2010	Beige	México	Dwelley x Bco. Sin. 92 ⁶
Blanoro	Beige	México	(L-4924 x Blanco Lechoso) x Bco. Sin. 92 ⁷
Hoga 021	Beige	México	Bco. Sin. 92 x Blanco Lechoso*
Hoga 340	Beige	México	Sandford x Bco. Sin. 92*
ICC 3421	Beige	Israel	P-4099 ⁸
Tipo Desi			
ICC 6306	Negro	Rusia	NEC 208 ⁸
ICC 3761	Negro	Irán	P-4376 ⁸
ICC 4418	Negro	Irán	P-5401-1 ⁸
ICC 3512	Café	Irán	P-4216-1 ⁸
ICC 5383	Café	India	NP-59-1 ⁸
ICC 13124	Café	India	P-1390/PI-450831 ⁸
ICC 14872	Café	India	H 79-100M ⁸
ICC 5613	Verde	India	851 ⁸

¹López García y Andrade Arias (1979); ²Gómez Garza (1983); ³Gómez-Garza y col (2003a); ⁴Gómez-Garza y Salinas-Pérez (2001b); ⁵Gómez-Garza y col (2003b); ⁶Valenzuela-Herrera y col (2016); ⁷Ortega-Murrieta y col (2016); ⁸Pundir y col (1988).

*MC. Milagros Ramírez Soto, CEVACU-INIFAP, Culiacán, Sinaloa.



ICC6306



ICC4418



ICC3761



ICC3512



ICC5383



ICC13124



ICC14872



ICC5613

Fig. 10. Genotipos de garbanzo tipo desi de la colección de ICRISAT.



Suprema 03



Progreso 95



Bco. Sin. 92



Sto. Dom. 82



Surutato 77



ICC3421



Hoga 340



Hoga 021



Blanco



Jumbo 2010

Fig 11. Genotipos de garbanzo tipo kabuli de la colección INIFAP e ICRISAT.

b Cuantificación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales de los extractos metanólicos se determinó por el método colorimétrico reportado por Singleton y col (1999) con pequeñas modificaciones. A 20 μL de extracto se le agregaron 220 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y la mezcla se dejó reposar por 3 min en oscuridad. Posteriormente, se agregaron 60 μL de una solución de carbonato de sodio al 7% (p/v) y se incubó por 90 min. La absorbancia de las muestras se midió a 750 nm utilizando un lector de microplacas modelo Multiskan Sky (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Se preparó una curva utilizando ácido gálico como estándar y el contenido de fenólicos totales se reportó como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra en base seca (mg EAG/ 100 g b.s.).

c Perfil de compuestos fenólicos

La metodología utilizada para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos es la descrita por Quintero-Soto y col (2018). Se tomaron 495 μL del extracto metanólico y se pasaron por una pre-columna C18. Los compuestos se eluyeron con ácido fórmico (1%)-acetonitrilo (4:6) y se secaron en un concentrador modelo 5301 (Eppendorf). La muestra seca se reconstituyó en 495 μL de metanol al 80% y se le adicionaron 5 μL de estándar interno (ácido 2-hidroxicinámico). Se inyectaron 10 μL del extracto en un equipo HPLC-DAD ACCELA (Thermo Fisher Scientific, Inc, Whaltman, EUA) y la separación se realizó en una columna FORTIS C18 (50 x 2.1 mm) (Fortis Technologies LTD., Cheshire, Inglaterra). Las fases móviles fueron agua-ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0.2 mL/min en un gradiente lineal de 95.5% a 40% de A en 40 min; finalmente la columna se equilibró con 100% de fase A durante 5 min. La detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. La identificación de los compuestos fenólicos en la muestra se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros UV de los picos cromatográficos de las muestras y estándares comerciales (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido sirínico, catequina, miricetina, quercetina, genisteína, kaempferol e isoramnetina), así como por espectrometría de masas utilizando un equipo LTQ-XL (Thermo Scientific, EUA) con una fuente de ionización por

electroasperjado (ESI) operando en modo positivo/negativo con voltaje y temperatura del capilar de 35 V y 300 °C, respectivamente. El análisis de los datos se llevó a cabo con ayuda del software Xcalibur versión 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) en modo de escaneo completo utilizando una relación m/z de 110 hasta 2000. Este análisis permitió conocer la masa molecular y fragmentos generados por los compuestos.

2 Caracterización del perfil de proteínas de almacenamiento

a Determinación de proteína total

Se utilizó el método 460.52 de la AOAC (2012) para la determinación de nitrógeno mediante un sistema Kjelttec modelo 1009 y 1002 (Tecator, Suecia). Se sometieron a digestión 0.2 g de muestra con 5 mL de ácido sulfúrico y la mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200 °C. Posteriormente, la muestra se diluyó con 10 mL de agua y destiló; el destilado se recibió en disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4 % con indicador. Estas muestras se titularon con una solución valorada de HCl 0.1 N y su contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total por el factor 6.25. La prueba se realizó por triplicado.

b Extracción y cuantificación de proteínas de almacenamiento

La extracción de las fracciones de proteína se realizó mediante el método descrito por Dziuba y col (2014) con algunas modificaciones. En la primera etapa la harina fue desengrasada: 100 g de harina se mezclaron con 2 L de hexano; la mezcla se agitó durante 4 h a 20 °C y centrifugó a 15,000 g por 10 min; el sobrenadante se eliminó y se recuperó la pastilla. Para la obtención de las proteínas, la pastilla se mezcló con 2 L de buffer de extracción I (H₂O desionizada estéril pH 8.0, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, PMSF 1 mM) y agitó durante 4 h a 20 °C en una placa de agitación con ayuda de un agitador magnético. La mezcla se centrifugó (15,000 g, 20 min) y se recuperaron el sobrenadante (sobrenadante 1) y la pastilla (residuo 1); al sobrenadante 1 se le agregaron 2 volúmenes de acetato de amonio-metanol (0.1 M) y se dejó reposar toda la noche (16 h) para precipitar las proteínas

presentes en la muestra. La pastilla obtenida de la precipitación se lavó con acetato de amonio-metanol 0.1 M (1 L), metanol (1 L) y acetona (1 L); entre cada lavado, las muestras se centrifugaron (15,000 g; 20 min; 4 °C), descartando los sobrenadantes y luego se dejó secar la pastilla hasta evaporar la acetona; la pastilla seca se resuspendió en agua (5 mL/ g de sólido seco) y se dializó (Membrana de celulosa, 6000-8000 Da, 25.5 mm x 30 m, Fisherbrand™, Whatman, EUA) contra agua (2 L) por 3 días con tres cambios de agua al día. El dializado se centrifugó (15,000 g, 20 min) y se recuperó el sobrenadante, el cual se liofilizo para obtener la fracción de albúminas.

Para la extracción de globulinas, el residuo 1 se resuspendió en 2 L de buffer de extracción II [Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0), NaCl 10 % (p/v), PMSF 1 mM, EDTA 10 mM], agitó durante 16 h a 20 °C en una placa de agitación, con ayuda de un agitador magnético, y centrifugó (15,000 g, 20 min). El sobrenadante recuperado se trató igual que el sobrenadante 1 para la precipitación, lavado y diálisis de las proteínas. Finalmente, el dializado se centrifugó (15,000 g, 20 min) recuperándose la pastilla correspondiente a la fracción de globulinas.

La concentración de albúminas y globulinas se determinó colorimétricamente utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) (Brown y col, 1989); el cual consiste en la reducción del ion Cu^{+2} a Cu^{+} en presencia de proteínas a pH elevado generando un complejo de color púrpura, el cual presenta un máximo de absorción a 550 nm. La concentración de proteínas se estimó a partir de una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

c Separación electroforética

La separación unidimensional de las proteínas se realizó por SDS-PAGE de acuerdo con el protocolo de Laemmli (1970). El extracto protéico se resuspendió en amortiguador de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2 % p/v, DTT 50 mM, anfolitas 0.2 % v/v, azul de bromofenol 0.001 % p/v) y separó en una unidad electroforética vertical MP3 (BioRad, Hercules, CA, EUA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido de BioRad (miosina, 201.24 kDa; β -galactosidasa, 114.32 kDa; albúmina de suero

bovino, 74.14 kDa; albúmina de huevo, 48.04 kDa; anhidrasa carbónica, 34.44 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 27.24 kDa; lisozima, 17.09 kDa y aprotinina, 6.25 kDa). Los extractos de albúminas y globulinas (equivalentes a 5 mg y 1 mg de harina, respectivamente) se mezclaron con un volumen equivalente de amortiguador de muestra [Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), SDS 2 % (p/v), glicerol 25 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 %] y aplicaron en pozos de geles de poliacrilamida de 12.5 % (p/v) para su separación (Cuadro 10). Las proteínas en el gel se tiñeron durante 2 h con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.25 % (p/v) (Sigma, St Louis, MO, EUA) en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético. El gel se destiñó con una solución de metanol-ácido acético-agua (40:10:50 v/v) por 3 h y las imágenes de los geles se obtuvieron con un sistema de fotodocumentación XRS (BioRad). El contenido de cada una de las proteínas en las diferentes subfracciones se estimó densitométricamente por medio del programa Image Lab (BioRad), para lo cual se seleccionó la misma área/volumen en cada una de las subfracciones, tomando como referencia la de mayor intensidad y volumen.

d Identificación de las proteínas

La identificación de las proteínas se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) como describen Salazar-Salas y col (2017). Primeramente, las bandas correspondientes a las proteínas de interés se recuperaron del gel utilizando un bisturí. Las muestras fueron lavadas con acetonitrilo, secadas al vacío, incubadas con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato de amonio 0.1 M (NH_4HCO_3) durante 30 min a 56 °C y posteriormente adicionadas con iodoacetamida 50 mM en NH_4HCO_3 0.1 M por 30 min a temperatura ambiente. Los geles se lavaron nuevamente con NH_4HCO_3 0.1 M y secaron al vacío; posteriormente se rehidrataron con una solución de digestión [5 μL de una solución de tripsina (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Promega, Madison, WI, EUA) más 40 μL de NH_4HCO_3 50 mM] y se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 18 h. Los péptidos obtenidos se desalaron utilizando puntas conteniendo resina tipo C18 en el extremo (Zip-Tip, Millipore, Billerica, MA, EUA).

Cuadro 10. Composición de los geles concentrador y separador utilizados en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Reactivo	Gel concentrador (10 mL)	Gel separador (10 mL)
	4%	12.50%
Acrilamida 30% (p/v): Bisacrilamida 2.67% (p/v)	1.3 mL	4.2 mL
Amortiguador de gel [Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL	—
Amortiguador de gel [Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10% (p/v)	0.1 mL	0.1 mL
Agua	6.1 mL	3.2 mL
Persulfato de amonio 10% (p/v)	120 µL	50 µL
TEMED	30 µL	30 µL

La mezcla de péptidos se analizó con un cromatógrafo de líquidos (ACCELA, ThermoScientific, San Jose, CA, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal (LTQ-XL, ThermoScientific) y una fuente de iones NanoSpray (3.0 kV) operando en modo positivo.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar de fase reversa usando un gradiente lineal de 5-80% de acetonitrilo durante 120 min. La adquisición de los espectros de masas se realizó con el programa Xcalibur 2.2 (ThermoScientific) en un rango de masa-carga (m/z) de 300–2000; los iones más intensos se fragmentaron por disociación inducida por colisión (CID). Los datos se analizaron con el programa Proteome Discoverer 1.3 usando el algoritmo SEQuest contra una base de datos referenciada. Los parámetros de búsqueda para modificaciones fueron los siguientes: cisteína carbamidometilada como fija y oxidación de metionina como variable.

3 Caracterización del perfil de péptidos

a Análisis BIOPEP

Previo a la obtención de los hidrolizados proteínicos se realizó un análisis *in silico* con la ayuda de la base de datos BIOPEP para predecir péptidos con actividad antioxidante en las proteínas de garbanzo (Minkiewicz y col, 2008b). En primer lugar, las secuencias de las proteínas identificadas en las fracciones albúminas y globulinas se examinaron con la herramienta "acción enzimática" disponible en BIOPEP para predecir las secuencias de péptidos teóricos escindidas por 5 proteasas [tripsina, pepsina, pancreatina papaína y subtilisina A (alcalasa)]. Además de la acción de enzimas individuales, se investigó una acción combinada de las enzimas pepsina y pancreatina para imitar el proceso de digestión gastrointestinal. En segundo lugar, los péptidos teóricos obtenidos de diversas proteasas fueron sometidos a la opción "buscar fragmentos activos". Finalmente, se visualizó una lista de posibles péptidos bioactivos y se seleccionaron sólo aquellos con potencial AA, lo que permitió conocer las enzimas generadoras de dichos péptidos para seleccionar la o las más prometedoras para la obtención de hidrolizados proteínicos con alto valor antioxidante.

b Obtención de hidrolizados proteínicos

Los hidrolizados proteínicos se elaboraron a partir de las fracciones de proteínas obtenidas previamente. Las proteínas (1 g de albúminas o globulinas) se resuspendieron en 10 mL de agua (pH 8) y colocaron en baño maría a 80 °C por 5 min para desnaturalizarlas y mejorar la disponibilidad de los sitios de corte de la enzima. La muestra se dejó enfriar a 50 °C durante 5 min, posteriormente se adicionó la enzima alcalasa (0.3 UA / g de proteína) y la hidrólisis se llevó a cabo durante 90 min a 50 °C, manteniendo el pH constante a 8.0 con NaOH 5 N. Después de la hidrólisis, la enzima se inactivó a 80 °C durante 20 min. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugaron a 5000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se filtró con la ayuda de filtros de membrana de 0.45 µm. Finalmente, el filtrado se pasó por tubos de corte de peso molecular de 10 kDa para eliminar restos de proteínas sin hidrolizar. El filtrado recuperado se liofilizó y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

c Purificación/ fraccionamiento de péptidos de los hidrolizados proteínicos

1) Primera purificación

Los hidrolizados de globulinas y albúminas se separaron por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) en una columna Luna C18 (150 x 4.6 mm) (Phenomenex, Inc, EUA). En cada corrida se inyectó el equivalente a 5 mg de hidrolizado. La elución se realizó usando un gradiente y las fases móviles agua-ácido fórmico (1 %) (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 0.2 mL/min: 0-20 min, 95.5-96% A; 20-68 min, 96-80% A; 68-115 min, 80-52% A; 115-120 min, 52-100% A. Tanto en albúminas como en globulinas se colectaron fracciones correspondientes a 30 min de la corrida; la fracción 1 abarcó los péptidos eluidos del minuto 5 al 35, la fracción 2 del minuto 35 al 65 y la fracción 3 del minuto 65 al 95.

2) Segunda purificación

Para la segunda purificación se tomó la fracción peptídica con mejores características AA y antidiabéticas en la purificación anterior. Se tomaron 5 mg de la fracción purificada y se inyectaron nuevamente en el cromatógrafo de líquidos; los

péptidos retenidos en la columna (Luna C18) se eluyeron utilizando las mismas fases móviles (agua-ácido fórmico al 1% y acetonitrilo) y flujo (0.2 mL/min) de la primera purificación. Se utilizó el siguiente gradiente: 0-20 min, 95.5-96% A; 20-35 min, 96-91% A; 35-40 min, 91-100% A. Las nuevas fracciones se colectaron tomando en cuenta su máximo de absorción a 214, 257 y 280 nm.

3) Tercera purificación

La tercera y última purificación se realizó a partir de la fracción que destacó en AA y antidiabética en la segunda purificación. Las condiciones de separación fueron similares a las purificaciones anteriores pero modificando el gradiente: 0-1 min, 99.5-98% A; 1-15 min, 98-94% A; 15-18 min, 94-20% A; 18-20 min, 20-100% A. Las nuevas fracciones se colectaron tomando en cuenta su máximo de absorción a 257 y 280 nm.

d Perfil de péptidos de la fracción purificada

Para determinar el perfil de péptidos de la fracción purificada primeramente se separaron 15 µL de la muestra por UPLC utilizando la columna, fases móviles y flujo descritos previamente. El gradiente empleado se describe en la sección **c-3**). La detección se realizó a 257 y 280 nm. Los péptidos se identificaron en un espectrómetro de masas LTQ-XL (Thermo Scientific, EUA) utilizando una fuente de ionización por electro-asperjado (ESI) operando en modo positivo con voltaje y temperatura del capilar de 35 V y 300 °C, respectivamente. La adquisición de los espectros de masas se realizó con el programa Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific, San José, CA, EUA) en un rango m/z de 50–2000 y los iones más intensos se fragmentaron mediante disociación inducida por colisión (CID). Los datos se analizaron con el programa Proteome Discoverer 1.2 usando el algoritmo SEQUEST contra una base de datos referenciada.

e Perfil de péptidos de los hidrolizados de albúminas y globulinas

Primeramente, la separación de los péptidos se realizó como se describe en la sección **c-1**), y la identificación como se describe en la sección **d**.

4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos

a Método ABTS

Se empleó el método desarrollado por Re y col (1999). Se tomaron 7.5 μL de muestra y se mezclaron con 292.5 μL de la solución del radical ABTS^{•+}. La mezcla se dejó reaccionar por 10 min a temperatura ambiente, protegida de la luz, posteriormente se leyó el cambio en la absorbancia a 734 nm respecto a la referencia del reactivo. La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS con el solvente de la muestra (metanol al 80%). Los valores fueron expresados como μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra en base seca (b.s.) determinados a partir de una curva patrón obtenida usando Trolox como estándar.

b Método DPPH

La actividad anti-radical DPPH de las muestras se determinó utilizando la metodología descrita por Brand-Williams y col (1995). Se preparó una solución DPPH (150 μM) disuelta en metanol. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 μL de cada muestra y se mezclaron con 180 μL de la solución DPPH (150 μM). Después de 30 min de incubación a 37 °C se midió la absorbancia a 510 nm en un lector de microplacas modelo Multiskan Sky (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA.). Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de Trolox y los datos se expresaron como μmol ET/100 g b.s.

c Método FRAP

El ensayo del poder de reducción/antioxidante férrico (FRAP) se llevó a cabo de acuerdo con Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP se preparó con 10 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM, 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 100 mL de amortiguador de acetato de sodio 300 mM, pH 3.6. El reactivo FRAP se preparó el mismo día, el ensayo se realizó en microplaca mezclando 20 μL de muestra y 280 μL de reactivo de FRAP; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca modelo Multiskan Sky (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA.). La

cuantificación se realizó empleando una curva de calibración de Trolox y los resultados fueron reportados como $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g b.s.}$

5 Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrolizados y las fracciones peptídicas

a ABTS

Se utilizó el método de Re y col (1999) con las modificaciones de Mejri y col (2017). Se tomó 1 μL de hidrolizado y se mezcló con 100 μL de la solución del radical ABTS. La mezcla se dejó reposar por 6 min a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se leyó el cambio en la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical ABTS.

b DPPH

Se utilizó la metodología descrita por Brand-Williams y col (1995) con las modificaciones de Mejri y col (2017). Se preparó una solución DPPH (100 μM) disuelta en etanol al 95%. Se tomaron 50 μL de cada hidrolizado o fracción y se mezclaron con 50 μL de la solución DPPH (100 μM). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 510 nm. Los resultados se expresarán como porcentaje de inhibición del radical DPPH.

6 Evaluación de la actividad antidiabética de los hidrolizados y las fracciones peptídicas

a Inhibición de la enzima α -amilasa

La enzima α -amilasa hidroliza los enlaces α -1-4 de los distintos carbohidratos presentes en la naturaleza, como el almidón, generando residuos libres de glucosa. La glucosa libre reacciona con el ácido 3,5-dinitrosalisílico a altas temperaturas y genera una coloración rojo-naranja, la intensidad del color es proporcional a la concentración de azúcares, de tal manera que si la enzima se inhibe no hay cambio de color. La inhibición de esta enzima se determinó siguiendo la metodología propuesta por Mojica y col (2015). Se mezclaron 5 μL de muestra (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 5 μL de una solución de α -amilasa (13 U/mL); la mezcla se incubó por 10 min a 25 °C, se

añadieron 5 μL de una solución de almidón al 1% y se incubó nuevamente durante 10 min a 25 °C. Se agregaron 25 μL del reactivo coloreado ácido dinitrosalicílico y la mezcla se colocó en baño maría a 100 °C por 5 min. Finalmente, la mezcla resultante se diluyó con 250 μL de agua destilada y se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro modelo Multiskan Sky (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA.). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición en relación al control positivo (acarbosea 0.1 M).

b Inhibición de la enzima α -glucosidasa

Se siguió el procedimiento de Mojica y col (2015), midiendo de manera indirecta la actividad de la α -glucosidasa a través del *p*-nitrofenol liberado por la α -glucosidasa cuando esta hidroliza el enlace alfa del compuesto *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido; una unidad de la enzima libera 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de *p*-nitrofenol cuyo máximo de absorción es a 405 nm, por lo que a mayor inhibición de la enzima, menor es la concentración de *p*-nitrofenol encontrada. Para la determinación, 25 μL de muestra (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mezclaron con 50 μL de la solución de α -glucosidasa (1 U/mL) y la mezcla se incubó durante 10 min a 25 °C. Posteriormente, se agregaron 25 μL de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (5 mM), la mezcla se incubó 5 min y se midió su absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición en relación al control positivo (acarbosea 0.1 M).

c Inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV

La inhibición de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP4) se determinó utilizando el kit MAK203 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). El ensayo determina la capacidad de la enzima DPP4 para cortar al dipéptido Gly-Pro del extremo amino del sustrato no fluorescente hidrodromuro de Gly-Pro-7-amido-4-metilcumarina (H-Gly-Pro-7-AMC) en presencia de un inhibidor; cada unidad de DPP4 que hidroliza al sustrato H-Gly-Pro-7-AMC genera 1 mmol del producto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC), el cual puede ser monitoreado fluorométricamente, por lo que mientras menor sea la fluorescencia mayor será la capacidad del inhibidor de inactivar a la enzima DPP4. Para el ensayo, 49 μL de muestra se mezclaron con 1 μL de enzima DPP4 y

la mezcla se incubó por 10 min a 37 °C protegida de la luz. Posteriormente se agregaron 23 µL de amortiguador de reacción (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0) y 2 µL de sustrato (H-Gly-Pro-7-AMC 1 mM), seguido de incubación por 15 min a 37 °C. Se midió la fluorescencia de las muestras utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 460 nm, respectivamente. Las muestras se incubaron nuevamente 15 min y se midió la fluorescencia. Los resultados se expresaron como IC₅₀ (µM).

El porcentaje de inhibición de la enzima DPP4 se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Pendiente} = ((\text{fluorescencia2} - \text{fluorescencia1}) / (\text{Tiempo2} - \text{Tiempo1})) * 100$$

$$\% \text{ inhibición de DPP4} = ((\text{pendienteEC} - \text{pendienteSM}) / \text{pendienteEC}) * 100$$

Donde:

Tiempo2 = 30 min

Tiempo1 = 15 min

pendienteEC = Pendiente del control

pendienteSM = Pendiente de la muestra

7 Análisis de acoplamiento molecular

Para localizar el sitio de unión de los péptidos purificados a las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV, se utilizaron los servidores web GRAMM-X-Protein-Protein y Rosetta FlexPepDock y el programa Discovery Studio 4.0 (DS 4.0, Accelrys Software Inc., San Diego, CA). Las estructuras tridimensionales de α -amilasa, α -glucosidasa y DPP4 se obtuvieron del banco de datos de proteínas (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Para α -amilasa se utilizó el archivo 1HNY, para α -glucosidasa el archivo 5NN8 y para DPP4 el archivo 1X70. Mediante el programa Discovery Studio se eliminaron los ligandos y moléculas de agua de los archivos para las tres enzimas; en el caso de DPP4 también se removió el monómero B. Los péptidos fueron diseñados en el mismo programa, a éstos se les agregó el campo de fuerza CHARMM36. Todos los archivos fueron guardados en formato PDB y enviados al servidor web de alineamiento molecular GRAMM-XProtein-Protein (versión 12.0) (Tovchigrechko y Vakser, 2005; Tovchigrechko y Vakser, 2006) utilizando los parámetros de referencia inicial del servidor. Como resultado el servidor arrojó diferentes conformaciones de

acoplamiento, con los respectivos aminoácidos del receptor (enzimas) que interactúan con el ligando (péptidos) y la magnitud de fuerza de esta unión; cada conformación presentó un valor global de energía mínima, a partir del cual se eligió la conformación óptima. Posteriormente se extrajo el complejo como un archivo PDB, utilizándolo como plantilla para realizar la dinámica molecular de refinado en el servidor web Rosetta FlexPepDock (Raveh y col, 2010; London y col, 2011), técnica que consiste en acoplar la proteína receptora y el ligando permitiendo flexibilidad total de la conformación del péptido y la cadena de unión del receptor. A partir de 200 estructuras de alta resolución por cada complejo enzima-ligando se seleccionó el complejo con la mejor energía global y de enlace para cada una de las tres enzimas y péptidos.

8 Asociación de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante

Una vez obtenidos los perfiles de compuestos fenólicos se estableció su asociación con los datos de AA (ABTS, DPPH y FRAP) mediante un análisis de componentes principales (PCA). Finalmente, se evaluó la AA de los compuestos fenólicos mayoritarios a la misma concentración que fueron encontrados en el extracto metanólico del genotipo más sobresaliente (ICC4418) para determinar su contribución a dicha actividad. También se evaluaron a concentraciones equimolares (50 μ M) por los tres métodos (ABTS, DPPH, FRAP) para calcular la actividad esperada que se comparó con el valor observado en la mezcla y así establecer el tipo de interacción (aditiva, sinérgica o antagonista).

9 Asociación de los hidrolizados proteínicos con la actividad antioxidante

Se realizó un análisis de componentes principales para establecer relaciones entre los genotipos de garbanzo con base en la AA de los hidrolizados proteínicos de los 18 genotipos de garbanzo estudiados. Finalmente, se determinó la AA y antidiabética de fracciones peptídicas purificadas a partir del genotipo más sobresaliente (ICC3761) para identificar los péptidos responsables de dichas actividades.

10 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando un diseño bifactorial con bloques completamente al azar empleando el programa STATGRAPHIC plus versión 5.1 (Statistical Graphics CorporationTM, Rockville, Maryland, EUA). Se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% para comparar las medias entre garbanzos del mismo tipo. Para la comparación entre los valores promedio de los genotipos de garbanzo desi y kabuli se realizó una prueba t. Las relaciones entre las variables analizadas para los genotipos de garbanzo se determinaron mediante un análisis de componentes principales (PCA) usando el programa STATA versión 11.1 (Stata Corp, College Station, Texas, USA).

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

1 Actividad antioxidante de los 18 genotipos de garbanzo evaluados

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los 18 genotipos de garbanzo analizados por tres métodos (ABTS, DPPH y FRAP), el menor valor de actividad antioxidante (AA) lo presentó el genotipo kabuli Jumbo 2010, mientras que el valor más alto lo mostró el genotipo desi ICC 4418 (Cuadro 11); esto coincide con el comportamiento observado por Segev y col (2010) y Marathe y col (2011) quienes observaron mayores valores antioxidantes en garbanzos pigmentados con respecto a garbanzos de color blanco o crema. El empleo de tres métodos para estimar la AA permite considerar diferentes mecanismos de acción y abarcar un mayor número de compuestos fenólicos, ya que la AA que presentan estos depende de su estructura (Prior y col, 2005).

Los valores de AA por ABTS para los genotipos tipo Kabuli variaron de 278.3 (Jumbo 2010) a 413.1 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ (Suprema 03) (Cuadro 11), los cuales son superiores a los reportados por Han y Baik (2008) en el garbanzo tipo kabuli cv. Dwelly (200 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$). Para los genotipos desi, la AA varió de 1210.2 (ICC13124) a 2,417 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ (ICC4418). Estos valores son superiores a los observados por Mekky y col (2015) en cinco genotipos de garbanzo desi de Egipto (162 - 207 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$), pero inferiores a los reportados por Zia-UI-Haq y col (2008) en genotipos de garbanzo pigmentados de Pakistán (3,720 - 4,530 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). El hecho de que los valores observados en este estudio sean superiores a los encontrados por Mekky y col (2015) podría deberse a las diferentes condiciones en las que fueron desarrollados los materiales, así como a las condiciones en las que se preparó el radical ABTS, ya que ellos lo diluyeron con agua, mientras que en nuestro caso se utilizó amortiguador PBS pH 7.4. El tipo de transferencia utilizada por el ensayo ABTS depende del pH, debido a que a valores altos disminuye el potencial de ionización, lo que se refleja en una mayor capacidad de donación de electrones con la desprotonación del grupo funcional reactivo.

Cuadro 11. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	ABTS ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$)	DPPH ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$)
KABULI			
Surutato 77	315.1 \pm 6.6 ^e	83.7 \pm 2.8 ^e	84.6 \pm 1.7 ^c
Sto. Dom. 82	325.4 \pm 2.2 ^{de}	38.8 \pm 2.9 ^h	48.5 \pm 3.7 ^d
Bco. Sin. 92	333.3 \pm 7.1 ^{de}	159.1 \pm 5.4 ^c	74.4 \pm 3.4 ^c
Progreso 95	366.3 \pm 7.3 ^{bc}	205.6 \pm 4.6 ^b	133.7 \pm 7.9 ^b
Suprema 03	413.1 \pm 8.5 ^a	199.4 \pm 4.9 ^b	159.5 \pm 10.5 ^a
Jumbo 2010	278.3 \pm 1.1 ^g	73.2 \pm 1.4 ^f	45.9 \pm 2.1 ^d
Blanoro	346.1 \pm 4.2 ^{cd}	93.2 \pm 4.2 ^e	80.7 \pm 3.0 ^c
Hoga 021	412.6 \pm 16.2 ^a	140.2 \pm 4.6 ^d	134.9 \pm 9.2 ^b
Hoga 340	390.5 \pm 15.6 ^{ab}	242.8 \pm 2.1 ^a	172.3 \pm 5.1 ^a
ICC3421	325.9 \pm 7.6 ^{de}	51.8 \pm 2.7 ^g	40.7 \pm 0.9 ^d
Promedio	350.6^B	128.4^B	97.50^B
DESI			
ICC6306	1928.7 \pm 105.1 ^b	1216.4 \pm 3.2 ^b	1082.7 \pm 10.9 ^b
ICC3761	1480.6 \pm 32.9 ^c	935.4 \pm 7.6 ^d	517.1 \pm 7.3 ^c
ICC4418	2417.5 \pm 213.1 ^a	1650.3 \pm 25.0 ^a	1181.4 \pm 20.4 ^a
ICC3512	1225.7 \pm 4.6 ^d	899.8 \pm 3.7 ^e	499.9 \pm 29.7 ^d
ICC5383	1370.7 \pm 52.7 ^{cd}	569.5 \pm 12.4 ^g	244.9 \pm 10.4 ^e
ICC13124	1210.2 \pm 19.1 ^d	332.9 \pm 14.4 ^h	92.5 \pm 5.7 ^f
ICC14872	1297.5 \pm 43.1 ^{cd}	732.5 \pm 7.3 ^f	244.3 \pm 7.5 ^e
ICC5613	1527.7 \pm 43.1 ^c	1162.7 \pm 4.2 ^c	618.8 \pm 13.9 ^c
Promedio	1557.3^A	937.5^A	560.2^A

ET: Equivalentes de Trolox. Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio de cada tipo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con una prueba t.

El método ABTS es generalmente utilizado para determinar la AA de moléculas que eliminan radicales por medio de la donación de átomos de hidrógeno y de antioxidantes de rompimiento de cadena (Leong y Shui, 2002). Esto sugiere que los compuestos presentes en los extractos de los genotipos de garbanzo son capaces de eliminar radicales libres por medio del mecanismo de donación de electrones/protones y son capaces de proteger matrices susceptibles a la degradación oxidativa causada por dichas especies reactivas.

La AA por DPPH varió de 38.8 (Sto. Dom. 82) a 242.8 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ (Hoga 340) para los garbanzos kabuli y de 332.9 (ICC13124) a 1,650.3 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ (ICC4418) para los genotipos desi (Cuadro 11). Han y Baik (2008) reportaron una AA por DPPH para el garbanzo kabuli cv. Dwelly de 47 $\mu\text{mol ET/100 g}$, valor que cae dentro del rango observado en este estudio para genotipos del mismo tipo. Por otro lado, Zia-UI-Haq y col (2008) reportaron valores DPPH de 105 a 124 $\mu\text{mol ET/100 g}$ para 4 garbanzos tipo desi de Paquistán, los cuales son inferiores a los observados en este estudio para los tipo desi. Marathe y col (2011) reportaron una mayor AA por DPPH en garbanzo tipo desi que en tipo kabuli, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en este estudio, ya que todos los genotipos tipo desi presentaron una AA mayor que la de los tipo kabuli (Cuadro 11).

En cuanto a la AA por FRAP, los valores fueron hasta $\cong 29$ veces mayores en los genotipos desi (92.5 a 1,181.4 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$) con respecto a los kabuli (40.7 a 172.3 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$) (Cuadro 11). Segev y col (2010) midieron la AA por el método FRAP de 17 genotipos de garbanzo (15 tipo desi y 2 tipo kabuli), encontrando valores de 80 a 100 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ para los genotipos kabuli y de 730 a 3,110 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ para los genotipos desi. Estos valores corresponden con los observados en el presente estudio para este método, los cuales variaron de 40.7 (ICC3421) a 172.3 (Hoga 340) $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ en los genotipos kabuli y de 92.5 (ICC13124) a 1,181.4 (ICC4418) $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ en los genotipos desi.

En cuanto a los garbanzos de México, se puede observar que durante el desarrollo de nuevos materiales además del tamaño y rendimiento del grano en la mayoría de los casos se ha mejorado indirectamente su AA, con excepción de Jumbo 2010 que posee un grano muy grande (Cuadro 9). Por ejemplo, Blanco

Sinaloa 92 presentó mayor AA por DPPH y FRAP que su progenitor Santo Domingo 82, mientras que Suprema 03 que resultó de la cruce entre dos líneas hermanas de Blanco Sinaloa 92 presentó los valores mas altos de AA por los tres métodos dentro de las variedades liberadas por INIFAP. En este caso, la selección de nuevos materiales de garbanzo con base en características agronómicas ha permitido en la mayoría de los casos mejorar características nutraceuticas del grano.

2 Contenido de compuestos fenólicos totales

De manera similar a lo observado en la AA, el contenido promedio de compuestos fenólicos totales en los genotipos desi fue casi 5 veces mayor que el observado en los de tipo kabuli, mostrando una amplia variabilidad entre los 18 genotipos estudiados (Cuadro 12).

Los fenólicos totales variaron de 24.1 (ICC3421) a 49.3 mg EAG/100 g (Hoga 340) en los garbanzos tipo kabuli, los cuales corresponden con lo reportado por Wang y col (2016) en un garbanzo del mismo tipo (34.4 mg EAG/100 g). En los genotipos desi se observaron valores de 69.9 (ICC13124) a 362.0 mg EAG/100 g (ICC4418), cuyo rango comprende los valores reportados por Heiras-Palazuelos y col (2013) (123-151 mg EAG/100 g) y Mekky y col (2015) (71-129 mg EAG/100 g) en garbanzos tipo desi. El mayor contenido de fenólicos totales en los genotipos desi puede asociarse a una mayor presencia de estos compuestos en la testa de garbanzos de color oscuro (Segev y col, 2010; Magalhaes y col, 2017), tal es el caso de los genotipos ICC4418 e ICC6306 que presentaron los valores más altos y ambos genotipos son de color negro.

3 Perfil de compuestos fenólicos

Cromatogramas representativos (UPLC) de los genotipos desi (ICC5383) y kabuli (Hoga 340) mostraron la presencia de 20 compuestos fenólicos (Fig. 12). Estos compuestos fueron clasificados en dos grupos principales de acuerdo a su espectro UV (Fig. 13): ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y flavonoides (flavan-3-ol, flavonoles e isoflavonas).

Cuadro 12. Contenido de fenólicos totales en los genotipos de garbanzo.

Genotipo	Fenólicos Totales (mg EAG/100 g)
KABULI	
Surutato 77	38.3 ± 1.8 ^c
Sto. Dom. 82	28.7 ± 1.1 ^{de}
Bco. Sin. 92	37.9 ± 1.2 ^c
Progreso 95	44.2 ± 1.4 ^b
Suprema 03	47.7 ± 1.3 ^a
Jumbo 2010	27.1 ± 1.3 ^e
Blanoro	30.7 ± 1.2 ^d
Hoga 021	40.0 ± 1.3 ^c
Hoga 340	49.3 ± 1.2 ^a
ICC 3421	24.1 ± 1.0 ^f
Promedio	36.8^B
DESI	
ICC 6306	311.9 ± 1.9 ^b
ICC 3761	173.4 ± 1.1 ^c
ICC 4418	362.0 ± 8.9 ^a
ICC 3512	136.7 ± 7.4 ^d
ICC 5383	100.2 ± 3.6 ^e
ICC 13124	69.9 ± 1.6 ^f
ICC 14872	102.1 ± 4.9 ^e
ICC 5613	161.3 ± 3.2 ^c
Promedio	177.2^A

Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio de cada tipo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con una prueba t.

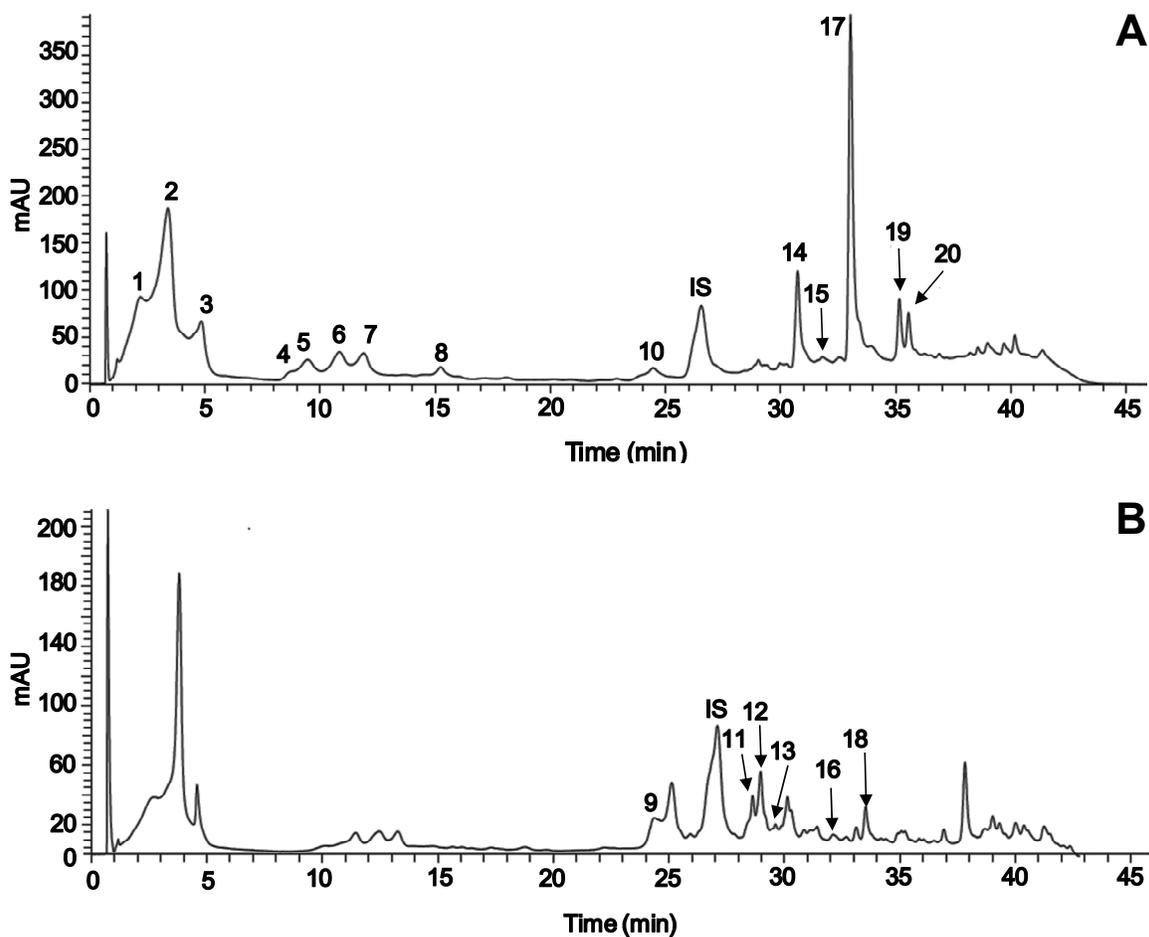


Figure 12. Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de los compuestos fenólicos presentes en extractos metanólicos de los genotipos ICC5383 (A) y Hoga 340 (B). 1, ácido sinápico hexóxido; 2, ácido gálico; 3, catequín pentósido; 4, ácido dihidroxibenzoico; 5, catequina; 6, vainillina; 7, ácido *p*-hidroxibenzoico; 8, ácido benzoico; 9, ácido *p*-coumárico; 10, ácido ferúlico; 11, miricetín-*O*-metil éter hexósido deoxihexósido pentósido; 12, miricetín-*O*-metil éter hexósido deoxihexósido; 13, rutina; 14, miricetina; 15, genisteína hexósido; 16, isoramnetín 3-*O*- β -D-glucopiranosido; 17, quercetina; 18, biocanina A; 19, kaempferol; 20, isoramnetina. Se utilizó ácido 2-hidroxicinámico como estándar interno (IS).

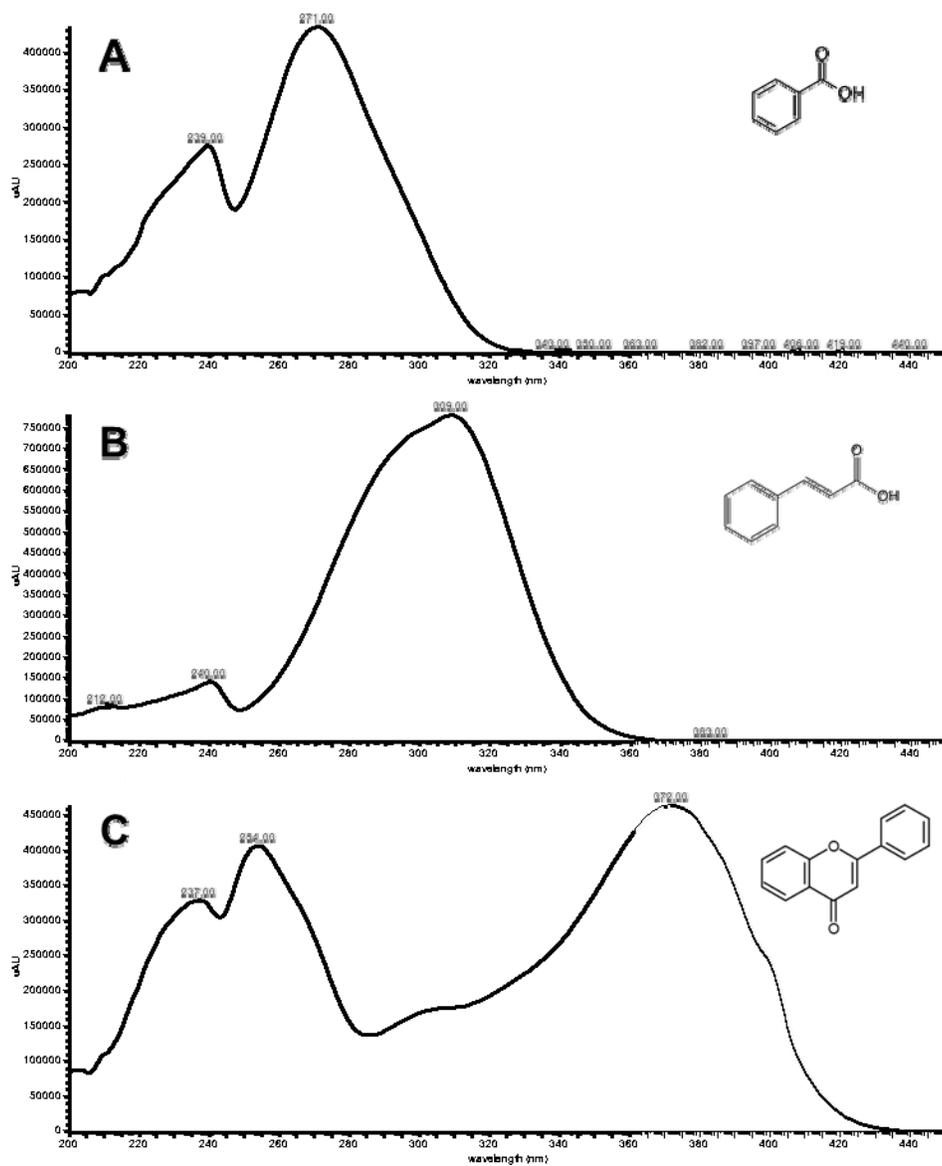


Fig 13. Espectros UV-Visible característicos de distintos tipos de compuestos fenólicos. (A) Ácido hidroxibenzoico. (B) Ácido hidroxicinámico. (C) Flavonoide.

Los ácidos hidroxibenzoicos presentan el grupo benzoilo como su único cromóforo por lo que su espectro UV solo exhibe una banda en el rango de 255-280 nm. En contraste, los ácidos hidroxicinámicos contienen un sistema cinamoilo responsable de la banda I de absorción (310-325 nm) (Abad-Garcia y col, 2009).

Los flavonoides muestran dos bandas de máxima absorción en el UV-Visible, una en la región de 240 a 285 nm (banda II) atribuida al anillo A, y la otra de 300 a 550 nm debida al anillo B (banda I). De éstas, la banda I es más útil porque proporciona información más selectiva, ya que todos los flavonoides absorben en la región de 240-285 nm. Los flavanoles exhiben sólo absorción de la banda II de 269-279 nm debido a la falta de conjugación entre los anillos A y B; lo mismo se aplica a las flavanonas, dihidroflavonoles e isoflavonas. Los flavonoles y las flavonas muestran una absorción de la banda I entre 300 y 380 nm (de Villiers y col, 2016). Cabe señalar que un aumento en el número de grupos hidroxilo induce un desplazamiento batocrómico, es decir entre más grupos hidroxilo tenga la molécula la posición de la banda se moverá hacia mayor longitud de onda, mientras que la orto-metilación y glicosilación producen un desplazamiento hipsocrómico.

En el Cuadro 13 se muestran los iones moleculares y fragmentos generados durante la identificación por MS de los picos separados por UPLC en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados. De los 20 compuestos fenólicos que fueron identificados, 8 (40%) son tipo ácido fenólico y 12 (60%) son tipo flavonoide. Esto concuerda con lo reportado por Mekky y col (2015) quienes registraron un mayor número flavonoides (56%) que de ácidos fenólicos (44%) en siete genotipos de garbanzo de Egipto.

El pico 1 mostró máximos de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) a 254 y 318 nm, indicando que es un derivado de ácido hidroxicinámico. Al analizarlo por MS se encontró un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 385$ y un fragmento con $m/z = 223$ que corresponde a la masa del ácido sinápico, mientras que la diferencia corresponde a la pérdida de una molécula de hexosa $[M-162-H]^-$, por lo que se identificó como ácido sinápico hexósido; también se observaron fragmentos de $m/z = 208$, 191 y 179 que corresponden a la posterior pérdida de metil, agua y carbono, respectivamente. Mekky y col (2015) reportaron este mismo compuesto en garbanzo de Egipto.

Cuadro 13. Compuestos fenólicos identificados por UPLC-ESI-MS en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados

Pico	TR	Experimental m/z [M-H] ⁻	Peso Teórico [M]	Fragmentos principales	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	Subclase	Referencias
1	2.20	385	386	223 (46.7), 208 (37.7), 191 (5.0), 179 (5.6)	254, 318	Ácido sinápico hexósido	Ácido hidroxicinámico	Mekky y col (2015)
2	3.41	169	170	125 (100), 97 (8.1)	239, 270	Ácido gálico*	Ácido hidroxibenzoico	Alshikh y col (2015); Mekky y col (2015)
3	4.84	421	422	289 (16.8), 245 (10.3), 221 (6.9), 203 (2.5), 123 (25.6), 109 (2.0)	245, 283	Catequina pentosa	Flavan-3-ol	
4	8.63	153	154	137 (100), 109 (35.8)	280, 309	Ácido dihidroxibenzoico	Ácido hidroxibenzoico	Aguilera y col (2015); Mekky y col (2015)
5	9.45	289	290	245 (52.6), 221 (58.6), 203 (70.8), 151 (10.1), 123 (38.4)	245, 280	Catequina*	Flavan-3-ol	Alshikh y col (2015); Chen y col (2015); Mekky y col (2015)
6	10.87	151	152	125 (99.0), 93 (40.5)	280, 309	Vainillina*	Ácido hidroxibenzoico	Mojica y col (2015)
7	11.87	137	138	93 (75.8)	255	Ácido <i>p</i> - hidroxibenzoico*	Ácido hidroxibenzoico	Aguilera y col (2015); Chen y col (2015); Mekky y col (2015)
8	15.24	121	122	77 (2.5)	282, 332	Ácido benzoico	Ácido hidroxibenzoico	Mekky y col (2015)

TR: Tiempo de Retención (min); $\lambda_{\text{máx}}$: longitud de onda de máxima absorción; [M-H]⁻: Ión molecular. *identificación del compuesto fue confirmada con estándares comerciales.

Cuadro 12. Continuación...

Pico	TR	Experimental m/z [M-H] ⁻	Peso Teórico [M]	Fragmentos principales	λ ^{máx} (nm)	Compuesto	Subclase	Referencias
9	24.27	163	164	119 (100)	292	Ácido p-coumárico	Ácido hidroxicinámico	Aguilera y col (2015); Mekky y col (2015)
10	24.71	355	356	193 (28.6), 117 (69.5)	248, 322	Ácido ferúlico hexósido	Ácido hidroxicinámico	Mekky y col (2015)
11	28.59	771	772	756 (16.5), 639 (32.8), 331 (20.2), 330 (9.1), 316 (38.9), 315 (81.9), 178 (9.4), 151 (10.7)	253, 357	Miricetin-O-metil éter hexósido deoxihexósido pentosido	Flavonol	Mekky y col (2015)
12	28.92	639	640	331 (40.8), 316 (100)	253, 357	Miricetin-O-metil éter hexósido deoxihexósido	Flavonol	Mekky y col (2015)
13	29.64	609	610	301 (100), 300 (88.7), 151 (10.3)	248, 249	Rutina*	Flavonol	Aguilera y col (2015)
14	30.74	317	318	245 (4.5), 151 (11.4)	249, 348	Miricetina*	Flavonol	Mojica y col (2015)
15	31.80	431	432	269 (41.0), 215 (56.3)	250, 320	Genisteín hexósido	Isoflavona	Aguilera y col (2015)
16	32.12	477	478	315 (63.1), 314 (47.8), 300 (76.1), 299 (46.3), 285 (77.4), 271 (20.6),	249, 347	Isoramnetina 3-O- β-D- glucopiranosido	Flavonol	Mekky y col (2015)
17	33.03	301	302	179 (11.9), 151 (6.3)	253, 369	Quercetina*	Flavonol	PubChem CID: 5280343

TR: Tiempo de Retención (min); λ^{máx}: longitud de onda de máxima absorción; [M-H]⁻: Ión molecular. *identificación del compuesto fue confirmada con estándares comerciales.

Cuadro 12. Continuación...

Pico	TR	Experimental m/z [M-H] ⁻	Peso Teórico [M]	Fragmentos principales	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	Subclase	Referencias
18	33.55	283	284	268 (10.6), 253 (5.7), 240 (2.4), 151 (2.9)	260, 322	Biocanina A	Isoflavona	Aguilera y col (2015); Mekky y col (2015)
19	35.15	285	286	257 (12.6), 229 (10.3), 216 (11.0)	260, 360	Kaempferol*	Flavonol	Mekky y col (2015)
20	35.55	315	316	301 (9.3), 300 (68.6), 285 (47.9), 261 (10.9), 122 (4.6)	264, 348	Isoramnetina*	Flavonol	PubChem CID: 5281654

TR: Tiempo de Retención (min); $\lambda_{\text{máx}}$: longitud de onda de máxima absorción; [M-H]⁻: Ión molecular. *identificación del compuesto fue confirmada con estándares comerciales.

El pico 2 fue identificado como ácido gálico por comparación de su tiempo de retención, espectro UV y patrón de fragmentación por MS con los de su estándar comercial. El análisis de MS en modo negativo mostró un ión molecular $[M-H]^-$ de $m/z = 169$ y dos fragmentos, uno de $m/z = 125$ que corresponde a la pérdida de una molécula de CO_2 $[M-44-H]^-$. Este patrón de fragmentación fue reportado previamente para ácido gálico por Mekky y col (2015) en garbanzo, Alshikh y col (2015) en lenteja y Stanisavljević y col (2015) en chícharo.

El pico 3 mostró un espectro de UV con $\lambda_{\text{máx}}$ de 245 y 283 nm, similares a las del estándar de catequina, pero con un tiempo de retención diferente. Al analizarlo por MS se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con una $m/z = 421$ y un fragmento en el modo negativo con $m/z = 289$, el cual coincide con el peso de la molécula de catequina, mientras que la m/z que se perdió corresponde a restos de pentosil $[M-132-H]^-$, por lo que fue identificado como catequín pentosa. Se han reportado distintos derivados glicosilados de catequina en leguminosas como chícharo y lenteja (Amarowicz y col, 2010; Stanisavljević y col, 2015; Singh y col, 2017).

En el pico 4 se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 153$, y al fragmentarse aparecieron dos iones, uno con $m/z = 137$ que muestra la pérdida de un oxígeno $[M-O-H]^-$ y otro con $m/z = 109$, lo que señala la pérdida de un grupo CO_2 $[M-44-H]^-$. El espectro UV y patrón de fragmentación concuerdan con lo reportado por Mekky y col (2015) y por Aguilera y col (2011a) para el ácido dihidroxibenzoico en extractos de garbanzo de Egipto, México y España.

El compuesto del pico 5 fue identificado por comparación de su tiempo de retención, espectro UV y patrón de fragmentación con el estándar de catequina. Al analizarse por MS apareció un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 289$, el cual corresponde al peso de la catequina y un fragmento con $m/z = 245$ debido a la pérdida de CO_2 $[M-44-H]^-$. Alshikh y col (2015), Mekky y col (2015) y Stanisavljević y col (2015) reportaron patrones de fragmentación similares al observado en este estudio para el compuesto catequina.

El pico 6 mostró un ión $[M-H]^-$ con $m/z = 151$ que al romperse generó dos fragmentos, uno con $m/z = 125$ debido al rompimiento del anillo $[M-26-H]^-$ y otro con $m/z = 93$ que muestra la posterior pérdida de un grupo metoxilo $[M-26-31-H-H]^-$, lo

cual corresponde con lo observado para el estándar de vainillina. Esto es similar a lo reportado por Mojica y col (2015) quienes observaron la presencia de vainillina en distintas variedades de frijol.

El compuesto del pico 7 se identificó como ácido *p*-hidroxibenzoico con base en su tiempo de retención y espectro UV, y su identidad fue confirmada por comparación de su patrón de fragmentación con el estándar. Por MS se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con una $m/z = 137$ que corresponde al peso del ácido *p*-hidroxibenzoico y su fragmentación mostró un ión de $m/z = 93$, que representa la pérdida de CO_2 $[M-44-H]^-$, esto concuerda con el patrón de fragmentación del estándar y el patrón reportado por Stanisavljević y col (2015) para ácido *p*-hidroxibenzoico.

En el pico 8 se encontró un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 121$ y un fragmento con $m/z = 77$ debido a la pérdida del CO_2 $[M-44-H]^-$ del grupo carboxilo, patrón de fragmentación que coincide con el reportado por Mekky y col (2015) para ácido benzoico.

El compuesto del pico 9 se identificó por comparación de su espectro UV, tiempo de retención y patrón de fragmentación los cuales coincidieron con los del estándar de ácido *p*-cumárico (Fig. 14). El ión molecular $[M-H]^-$ presentó una $m/z = 163$ y un fragmento con $m/z = 119$ por la pérdida de CO_2 $[M-44-H]^-$. Este patrón de fragmentación es similar al reportado por otros autores para ácido *p*-cumárico en garbanzo y otras leguminosas (Alshikh y col, 2015; Mekky y col, 2015; Stanisavljević y col, 2015).

En compuesto del pico 10 se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 355$ que al romperse generó un fragmento con $m/z = 193$ que corresponde al peso del ácido ferúlico, la m/z que desapareció representa la pérdida de una molécula de hexosa $[M-162-H]^-$, por lo que este compuesto se identificó como ácido ferúlico hexósido. La presencia de este compuesto ha sido reportada previamente en garbanzo de Egipto por Mekky y col (2015).

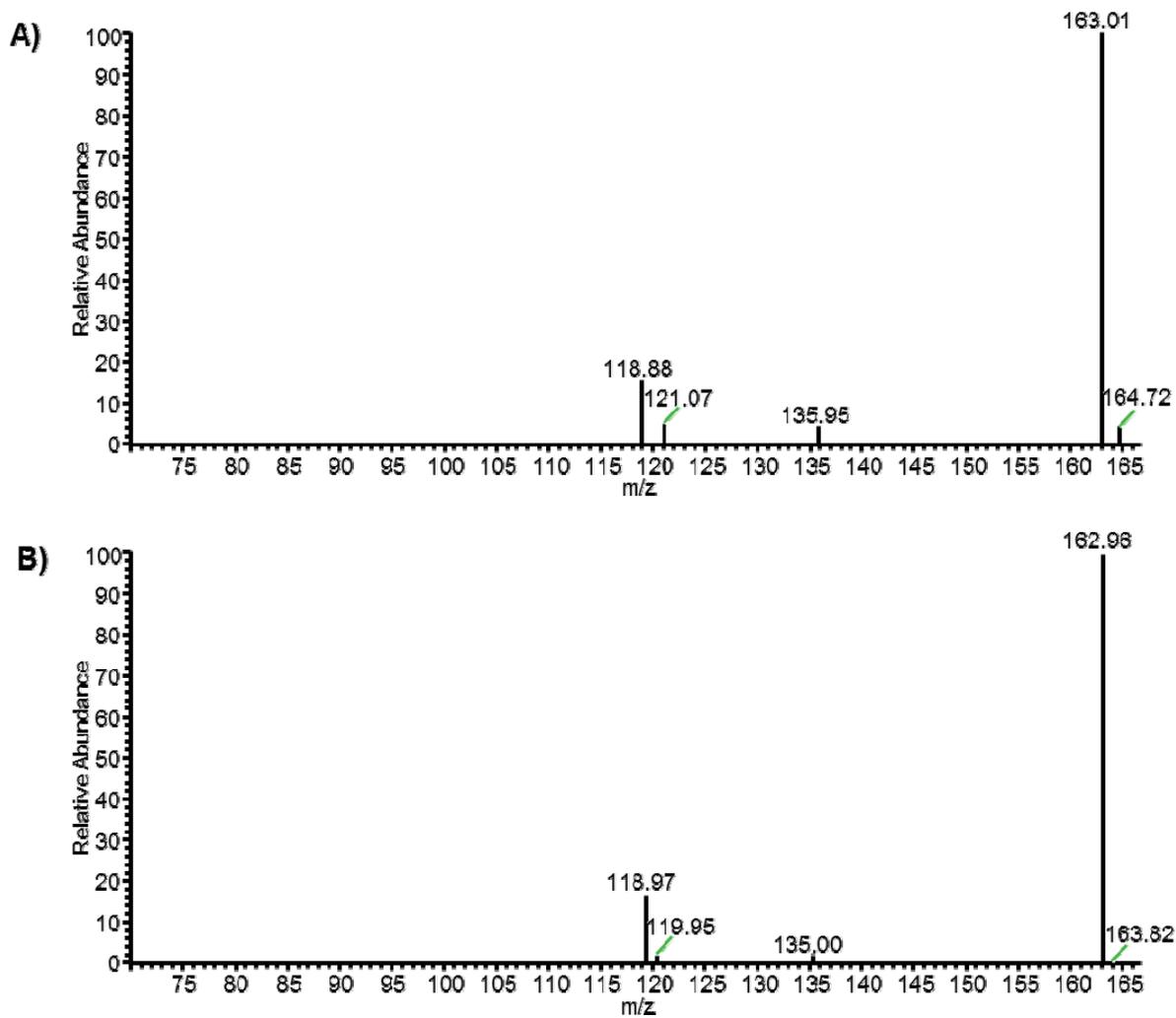


Fig 14. Espectro de masas MS^2 del ión de $m/z = 164$ del ácido *p*-cumárico. (A) Muestra. (B) Estándar comercial.

Los picos 11 y 12 mostraron espectros UV similares al estándar del compuesto miricetina. En el pico 11 se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 771$, y entre los iones de sus fragmentos tenemos uno con $m/z = 639$ por la pérdida de un grupo pentosil $[M-132-H]^-$ que posteriormente se rompe dando iones con $m/z = 330$ que corresponden a la pérdida de una molécula de hexosa y una deoxihexosa $[M-308(162-146)-H]^-$ y el ión con $m/z = 316$ muestra la pérdida del grupo metilo $[M-308-15-H]^-$ y corresponden al peso de la molécula de miricetina, por lo que fue identificado como miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido pentósido. En el pico 12 apareció un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 639$, así como dos fragmentos, uno con $m/z = 331$ debido a la pérdida de dos moléculas, una hexosa y una deoxihexosa $[M-308(162-146)-H]^-$, y otro con $m/z = 316$ que corresponde a la pérdida de un grupo metilo $[M-308-15-H]^-$, y concuerda con el peso de la molécula de miricetina por lo que fue identificado como miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido. Estos compuestos fueron reportados previamente por Mekky y col (2015)

El pico 13 fue identificado como rutina, el cual presentó un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 609$ que corresponde al peso de la molécula de rutina y al romperse aparecieron dos fragmentos, uno de $m/z = 301$ correspondiente a quercetina y representa la pérdida del disacárido rutinosa $[M-308-H]^-$ y otro de $m/z = 151$ debido a la ruptura del disacárido. Este patrón de fragmentación concuerda con el observado para el estándar de rutina y es similar a lo reportado por Aguilera y col (2011a), Mekky y col (2015) y Stanisavljević y col (2015) para rutina en garbanzo y chícharo.

El pico 14 fue identificado con base en su tiempo de retención, espectro UV y patrón de fragmentación. Por MS se observó un ión molecular $[M-H]^-$ de $m/z = 317$ que concuerda con el peso de la molécula de miricetina, y sus fragmentos $m/z = 245$ y 151 corresponden con el patrón de fragmentación del estándar de miricetina.

En el pico 15 se observó un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 431$ que al romperse generó un fragmento con $m/z = 269$ correspondiente a la pérdida de un residuo de hexosa $[M-162-H]^-$, y concuerda con el peso molecular de la genisteína, por lo que fue identificado como genisteín hexósido. Este compuesto fue previamente reportado en garbanzo por Aguilera y col (2011a).

En el pico 16 se observó un espectro UV similar al del flavonoide isoramnetina pero con un tiempo de retención diferente al del estándar. Al ser analizado por MS (Fig. 15) apareció un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 477$ que al romperse generó un fragmento con $m/z = 315$, el cual corresponde a la pérdida de una hexosa $[M-162-H]^-$ y concuerda con el peso de la isoramnetina. El ión de $m/z = 271$ es producto de la pérdida de un CO_2 , mientras que el ión con $m/z = 151$ ocurre por la fragmentación del anillo C. Mekky y col (2015) reportaron este patrón de fragmentación para un derivado de la isoramnetina por lo que el pico 16 fue identificado como isoramnetín 3-O- β -D-glucopiranosido.

El compuesto del pico 17 fue identificado por comparación de su tiempo de retención, espectro UV y patrón de fragmentación. Por MS se observó un ión molecular $[M-H]^-$ de $m/z = 301$, el cual corresponde al peso de la quercetina. Otros fragmentos importantes observados tuvieron una $m/z = 179$ y 151 , lo cual concuerda con los del estándar de quercetina y lo previamente reportado por Mekky y col (2015) para este compuesto.

El pico 18 se identificó como una isoflavona con base en su espectro UV y se encontró un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 283$, que al romperse forma el fragmento con $m/z = 268$ debido a que perdió un grupo metilo $[M-15-H]^-$, y otro con $m/z = 253$ por la pérdida de un segundo grupo metilo $[M-15-15-H]^-$. Aguilera y col (2011a) reportaron igualmente un ión molecular con $m/z = 283$ y lo identificaron como biocanina A en dos variedades de garbanzo.

El pico 19 fue identificado como kaempferol por comparación de sus espectros UV y tiempo de retención. Su identidad fue comprobada por medio de su patrón de fragmentación. En este pico apareció un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 285$ y fragmentos con $m/z = 257$, 229 y 216 , los cuales concuerdan con el patrón de fragmentación del estándar kaempferol. La presencia de kaempferol y sus derivados ha sido previamente reportada en garbanzo y otras leguminosas por distintos investigadores (Amarowicz y col, 2010; Aguilera y col, 2011a; Alshikh y col, 2015; Mekky y col, 2015; Stanisavljević y col, 2015).

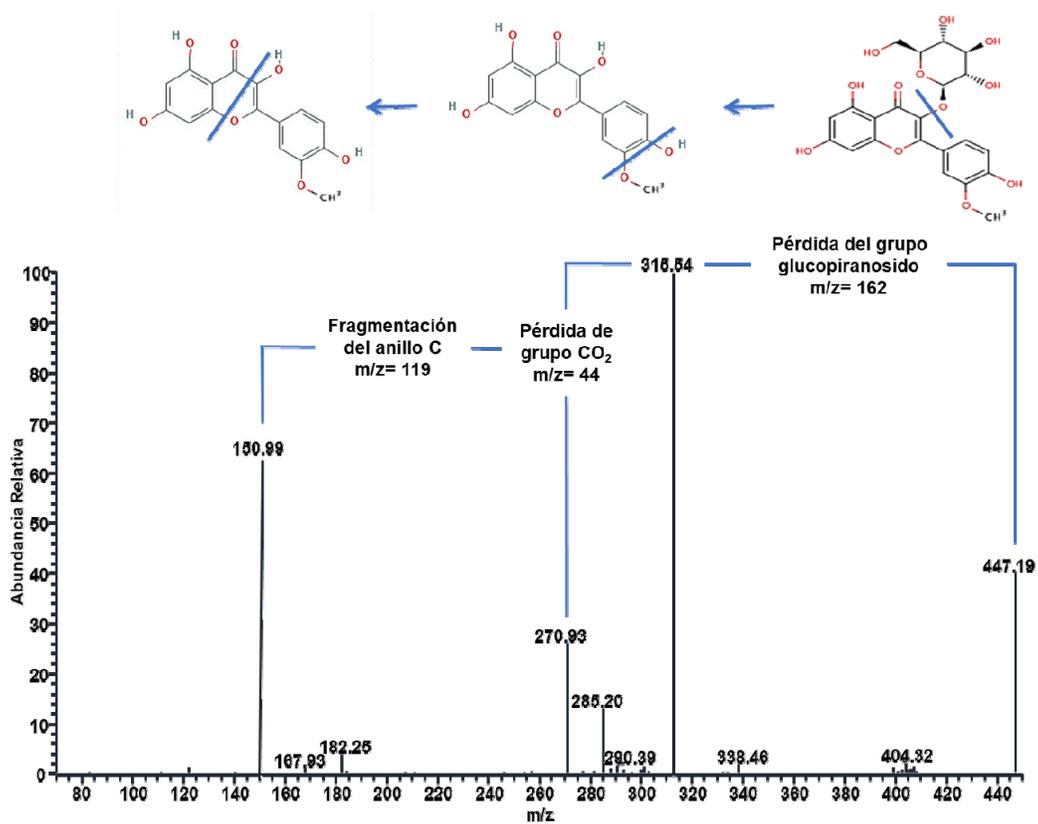


Fig 15. Espectro de masas MS² del compuesto isoramnetín 3-O-β-D-glucopiranosido (m/z= 477).

El pico 20 se identificó con base en su tiempo de retención, espectro UV y patrón de fragmentación como isoramnetina y su identidad fue confirmada con su estándar. En este pico apareció un ión molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 315$ que al fragmentarse generó un ión de $m/z = 300$ que corresponde a la pérdida de un grupo metilo $[M-15-H]^-$ y concuerda con el peso de un residuo de quercetina. Es importante mencionar que a pesar de que se encontraron en la literatura derivados de isoramnetina en garbanzo, no se encontraron reportes en donde se informe de la presencia de esta aglicona en leguminosas. Esto podría deberse a la base genética de los materiales que se manejaron en este estudio.

4 Contenido de compuestos fenólicos individuales

La suma del contenido promedio de compuestos tipo ácido fenólico en los garbanzos kabuli (388.45 $\mu\text{g/g}$) fue mayor que en los desi (238.46 $\mu\text{g/g}$). Estos compuestos son encontrados mayormente en los cotiledones del grano de garbanzo (Sreerama y col, 2010), lo que explica su mayor acumulación en los genotipos tipo kabuli que presentan granos grandes con una mayor proporción de cotiledones con respecto a los genotipos desi. En contraste, el contenido de flavonoides fue mayor en los garbanzos tipo desi (184.06 $\mu\text{g/g}$) que en los kabuli (108.03 $\mu\text{g/g}$). Esto se puede atribuir a que los flavonoides son los principales responsables del color de la testa en los genotipos tipo desi, los cuales además poseen granos de tamaño pequeño y un mayor porcentaje de testa.

El contenido individual de ácidos fenólicos en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados se muestra en el Cuadro 14. De los ocho compuestos identificados, todos los genotipos presentaron ácido sinápico hexósido, ácido gálico y ácido *p*-hidroxibenzoico, observándose en mayor proporción en los genotipos kabuli. El compuesto mayoritario fue el ácido sinápico hexósido, tanto para los genotipos kabuli (204.19 $\mu\text{g/g}$) como para los desi (123.90 $\mu\text{g/g}$). Estos valores son mayores que los reportados por Parmar y col (2016) para ácido sinápico en las variedades de garbanzo PBG 5 (20 $\mu\text{g/g}$) y BG1053 (40 $\mu\text{g/g}$).

Cuadro 14. Contenido de ácidos fenólicos en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	Ácido sináptico hexósido ¹	Ácido gálico ²	Ácido dihidroxibenzoico ¹	Vainillina ²	Ácido p-hidroxibenzoico ²	Ácido benzoico ¹	Ácido p-coumárico ²	Ácido ferúlico hexósido ¹
KABULI								
Surutato 77	338.3 ± 6.0 ^b	225.7 ± 0.9 ^a	ND	0.96 ± 0.04 ^a	85.8 ± 7.5 ^a	3.1 ± 0.2 ^b	ND	2.4 ± 0.3 ^c
Sto Dom. 82	132.8 ± 0.5 ^f	133.7 ± 1.3 ^d	ND	0.43 ± 0.05 ^d	28.4 ± 0.1 ^c	ND	ND	0.9 ± 0.1 ^d
Bco. Sin. 92	402.6 ± 12.5 ^a	201.5 ± 4.4 ^b	3.3 ± 0.3 ^b	0.89 ± 0.06 ^a	53.4 ± 4.8 ^b	ND	ND	2.3 ± 0.1 ^c
Progreso 95	207.9 ± 4.6 ^{de}	113.1 ± 1.5 ^{ef}	ND	0.95 ± 0.04 ^a	5.8 ± 0.5 ^d	ND	ND	9.7 ± 0.5 ^a
Suprema 03	183.7 ± 15.6 ^e	119.2 ± 6.2 ^e	2.9 ± 0.1 ^c	0.40 ± 0.02 ^d	5.8 ± 0.2 ^d	ND	ND	4.5 ± 0.5 ^b
Jumbo 2010	115.8 ± 3.2 ^f	104.7 ± 1.7 ^f	ND	0.59 ± 0.02 ^c	19.5 ± 1.2 ^c	3.1 ± 0.1 ^b	ND	1.3 ± 0.02 ^{cd}
Blanoro	235.6 ± 16.2 ^{cd}	194.9 ± 2.4 ^b	2.4 ± 0.1 ^d	0.78 ± 0.02 ^b	49.1 ± 3.0 ^b	3.7 ± 0.2 ^a	ND	4.1 ± 0.3 ^b
Hoga 021	143.9 ± 60.4 ^f	108.1 ± 0.9 ^f	ND	0.63 ± 0.07 ^c	22.0 ± 6.5 ^c	2.4 ± 0.1 ^c	4.1 ± 0.5 ^a	8.6 ± 0.2 ^a
Hoga 340	37.5 ± 2.0 ^g	44.5 ± 3.4 ^g	1.9 ± 0.1 ^e	0.45 ± 0.04 ^d	4.8 ± 0.3 ^d	ND	2.1 ± 0.6 ^b	8.9 ± 0.9 ^a
ICC3421	243.8 ± 2.6 ^c	183.9 ± 2.0 ^c	4.2 ± 0.2 ^a	ND	56.6 ± 2.3 ^b	ND	ND	ND
DESI								
ICC6306	214.2 ± 2.6 ^a	111.9 ± 2.7 ^a	7.2 ± 0.3 ^a	1.25 ± 0.03 ^b	52.6 ± 4.2 ^a	15.7 ± 0.7 ^a	ND	4.7 ± 0.3 ^b
ICC3761	151.8 ± 9.0 ^c	109.3 ± 3.5 ^{ab}	ND	1.11 ± 0.07 ^c	24.3 ± 6.4 ^c	ND	ND	4.4 ± 0.1 ^{bc}
ICC4418	172.2 ± 2.7 ^b	97.1 ± 1.8 ^b	ND	1.96 ± 0.01 ^a	32.8 ± 0.7 ^b	10.5 ± 0.3 ^b	ND	7.4 ± 0.2 ^a
ICC3512	115.7 ± 3.9 ^d	76.5 ± 5.2 ^c	1.9 ± 0.1 ^d	0.78 ± 0.03 ^d	4.6 ± 0.2 ^{ef}	ND	ND	1.9 ± 0.1 ^f
ICC5383	146.3 ± 0.7 ^c	104.1 ± 2.4 ^{ab}	6.6 ± 0.2 ^b	0.87 ± 0.02 ^d	14.3 ± 0.2 ^d	2.6 ± 0.1 ^c	ND	3.2 ± 0.1 ^d
ICC13124	41.3 ± 0.8 ^e	37.2 ± 0.8 ^d	2.9 ± 0.1 ^c	0.43 ± 0.02 ^e	1.6 ± 0.1 ^f	ND	0.91 ± 0.1	0.8 ± 0.1 ^g
ICC14872	107.5 ± 5.5 ^d	96.6 ± 12.4 ^b	ND	0.84 ± 0.08 ^d	15.6 ± 1.1 ^d	ND	ND	2.6 ± 0.1 ^e
ICC5613	42.2 ± 4.4 ^e	37.5 ± 2.5 ^d	ND	1.88 ± 0.01 ^a	10.6 ± 0.6 ^{de}	ND	ND	4.1 ± 0.2 ^c
LOD	0.0225	0.0130	0.0005	0.0017	0.0094	0.0005	0.0008	0.0011

¹µg equivalentes de aglicona/g de muestra bs. 2µg/g de muestra bs. ND, No detectado. LOD, Limite de detección (mg/mL). Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas (p < 0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

El segundo ácido fenólico más abundante fue el ácido gálico con valores de 44.5 a 225.7 $\mu\text{g/g}$ en los genotipos kabuli Hoga 340 y Surutato 77, respectivamente, mientras que en los genotipos desi su contenido varió de 37.2 $\mu\text{g/g}$ en ICC13124 a 111.9 $\mu\text{g/g}$ en ICC6306 (Cuadro 14). Los valores promedio para kabuli y desi fueron 142.92 y 83.80 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estos valores son inferiores a los reportados por Wang y col (2016) para la suma de las fracciones libre, ligada y conjugada en un genotipo de garbanzo de la India (217.21 $\mu\text{g/g}$).

El ácido dihidroxibenzoico solo se encontró en 5 genotipos kabuli (Blanco Sinaloa 92, Suprema 03, Blanoro, Hoga 340 e ICC3421) y su contenido varió de 1.9 a 4.2 $\mu\text{g/g}$, mientras que en los de tipo desi se encontró en 4 genotipos con valores de 1.9 a 7.2 $\mu\text{g/g}$. Estos valores caen dentro del rango reportado por Aguilera y col (2011a) para las variedades de garbanzo Blanco Sinaloa (0.44 $\mu\text{g/g}$) y Castellano (13.39 $\mu\text{g/g}$).

La vainillina se identificó en todos los materiales con excepción del genotipo kabuli ICC3421, presentando rangos de 0.40 a 0.96 $\mu\text{g/g}$ para kabuli y de 0.43 a 1.96 $\mu\text{g/g}$ para desi. Estos valores son inferiores a lo reportado por Parmar y col (2016) en dos genotipos de garbanzo cafés (640 $\mu\text{g/g}$); esta diferencia tan grande podría deberse al método de extracción utilizado por estos autores, quienes utilizaron hidrólisis alcalina y una posterior extracción con una mezcla de éter de petróleo y ácido acético.

En cuanto al ácido *p*-hidroxibenzoico, los contenidos fueron 1.7 veces superiores en los genotipos kabuli (33.12 $\mu\text{g/g}$) que en los desi (19.58 $\mu\text{g/g}$). Magalhaes y col (2017) no observaron diferencias en el contenido de este compuesto al contrastar el valor promedio de 5 genotipos kabuli (34.96 $\mu\text{g/g}$) y uno desi (35.1 $\mu\text{g/g}$).

El ácido benzoico se detectó en cuatro de los genotipos kabuli (Surutato 77, Jumbo 2010, Blanoro y Hoga 021) con valores de 2.4 a 3.7 $\mu\text{g/g}$ y en tres genotipos desi (ICC6306, ICC4418 e ICC5383) donde varió de 2.6 a 15.7 $\mu\text{g/g}$.

El ácido *p*-coumárico solamente se encontró en los genotipos kabuli Hoga 021 (4.1 $\mu\text{g/g}$) y Hoga 340 (2.1 $\mu\text{g/g}$), así como en el tipo desi ICC13124 (0.91 $\mu\text{g/g}$). Stanisavljević y col (2015) reportaron un contenido de ácido *p*-coumárico de 2.14 a

3.23 $\mu\text{g/g}$ en la testa de cuatro variedades de chícharo, los cuales caen dentro del rango observado en el presente estudio.

El contenido de ácido ferúlico hexósido en los genotipos tipo desi vario de 0.8 a 7.4 $\mu\text{g/g}$ y en los kabuli varió de 1.3 a 9.7 $\mu\text{g/g}$, con excepción del genotipo ICC3421 en donde no se detectó (Cuadro 14). Estos valores son inferiores al reportado por Kalogeropoulos y col (2010) para ácido ferúlico en garbanzo (125.7 $\mu\text{g/g}$), pero son similares a los reportados por Alshikh y col (2015) para este ácido en seis variedades de lentejas (0.30 a 2.82 $\mu\text{g/g}$).

Los compuestos fenólicos del tipo flavonoides incluyen flavan-3-oles, isoflavonas y flavonoles, entre otros; compuestos identificados en este estudio (Cuadro 15). Estos flavonoides se encontraron principalmente en los garbanzos pigmentados (desi) y todos los genotipos (kabuli y desi) presentaron los flavan-3-oles catequina y catequina pentosa. Alshikh y col (2015) reportaron rangos de catequina que van de 15.0 a 78.4 $\mu\text{g/g}$ para 5 genotipos de lentejas, valores similares a los obtenidos en este estudio para catequina (4.7 a 92.4 $\mu\text{g/g}$ para kabuli y 5.5 a 72.2 $\mu\text{g/g}$ para desi) y catequín pentósido (13.3 a 100.1 $\mu\text{g/g}$ para kabuli y 13.4 a 92.8 $\mu\text{g/g}$ para desi).

El flavonol miricetina se encontró en 4 genotipos kabuli (Progreso 95, Blanoro, Hoga 021 y Hoga 340) con valores de 0.9 a 2.1 $\mu\text{g/g}$, mientras que en los genotipos desi el contenido varió de 5.2 a 21.9 $\mu\text{g/g}$. Gutiérrez-Urbe y col (2011) reportaron valores de 2.30 $\mu\text{g/g}$ en testa de frijol chino, sin embargo no pudieron detectarlo en grano entero y cotiledón; esto coincide con el hecho de que este tipo de compuestos se almacena principalmente en la testa y que los genotipos desi presentan mayor contenido de esta estructura del grano (Sreerama y col, 2010; Chavez-Ontiveros y col, 2020). Por otro lado, los dos derivados de miricetina, miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido pentósido (1.5 a 1.7 $\mu\text{g/g}$) y miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido (0.5 a 1.67 $\mu\text{g/g}$) solo estuvieron presentes en tres genotipos kabuli (Blanoro, Hoga 021 y Hoga 340) desarrollados en el campo experimental del INIFAP Costa de Hermosillo, Sonora (CECH-INIFAP) (Cuadro 15). Estos valores son inferiores a los reportados por Dueñas y col (2007) y Magalhaes y col (2017) para el compuesto miricetín-3-O-ramnósido en lenteja (5.95 $\mu\text{g/g}$) y garbanzo tipo desi (7.4 $\mu\text{g/g}$).

Cuadro 15. Contenido de flavonoides en los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	Catequin pentosido ¹	Catequina ²	Miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido o pentosido ¹	Miricetín-O-metil éter hexósido deoxihexósido ¹	Rutina ²	Miricetina ²
KABULI						
Sto Dom. 82	56.6 ± 2.7 ^b	47.1 ± 1.5 ^a	ND	ND	ND	ND
Surutato 77	79.4 ± 6.2 ^c	92.4 ± 3.3 ^c	ND	ND	ND	ND
Bco. Sin. 92	100.1 ± 7.7 ^a	29.3 ± 0.9 ^d	ND	ND	ND	ND
Progreso 95	49.4 ± 2.7 ^c	8.7 ± 0.3 ^g	ND	ND	ND	1.7 ± 0.1 ^a
Suprema 03	47.9 ± 4.1 ^c	24.2 ± 0.2 ^{ef}	ND	ND	ND	ND
Jumbo 2010	30.2 ± 1.3 ^d	20.6 ± 1.9 ^f	ND	ND	ND	ND
Blanoro	71.2 ± 4.6 ^b	48.5 ± 1.6 ^c	ND	0.53 ± 0.08 ^b	0.26 ± 0.01 ^b	0.9 ± 0.1 ^b
Hoga 021	34.1 ± 1.6 ^d	25.3 ± 1.6 ^{de}	1.7 ± 0.14 ^a	1.61 ± 0.20 ^a	0.62 ± 0.07 ^a	2.1 ± 0.4 ^a
Hoga 340	13.3 ± 0.5 ^e	4.7 ± 0.1 ^g	1.5 ± 0.03 ^b	1.67 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.10 ^a	1.2 ± 0.1 ^b
ICC3421	94.8 ± 0.3 ^a	64.9 ± 0.4 ^b	ND	ND	ND	ND
DESI						
ICC6306	71.8 ± 3.1 ^b	72.2 ± 4.1 ^a	ND	ND	ND	17.8 ± 0.5 ^b
ICC3761	59.6 ± 4.1 ^c	41.6 ± 0.7 ^b	ND	ND	ND	9.0 ± 0.2 ^c
ICC4418	82.5 ± 0.2 ^a	41.4 ± 2.3 ^b	ND	ND	ND	21.9 ± 0.3 ^a
ICC3512	34.2 ± 1.0 ^e	10.9 ± 0.3 ^e	ND	ND	ND	8.5 ± 0.1 ^{cd}
ICC5383	58.0 ± 1.3 ^c	20.7 ± 0.8 ^d	ND	ND	ND	7.2 ± 0.5 ^d
ICC13124	13.4 ± 0.6 ^f	10.4 ± 0.4 ^{ef}	ND	ND	ND	5.2 ± 0.4 ^e
ICC14872	48.2 ± 1.5 ^d	35.6 ± 1.5 ^c	ND	ND	ND	8.3 ± 1.3 ^{cd}
ICC5613	38.4 ± 2.8 ^e	5.5 ± 0.1 ^g	ND	ND	ND	18.9 ± 0.7 ^b
LOD	0.0068	0.0059	0.0009	0.0008	0.0003	0.002

¹µg equivalentes de aglicona/g de muestra bs. ²µg/ g de muestra bs. ND, No detectado. LOD, Limite de detección (mg/mL). Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas (p <0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Cuadro 15. Continuación...

Genotipo	Isoramnetín					
	Genisteín hexósido ¹	3-O-β-D-glucopiranosido ¹	Quercetina ²	Biocanina A ¹	Kaempferol ²	Isoramnetina ²
KABULI						
Surutato 77	ND	ND	ND	2.3 ± 0.1 ^d	ND	ND
Sto. Dom. 82	ND	ND	ND	0.6 ± 0.1 ^e	ND	ND
Bco. Sin. 92	ND	ND	ND	5.3 ± 0.3 ^b	0.59 ± 0.1 ^b	ND
Progreso 95	1.8 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.2 ^a	ND	8.1 ± 0.8 ^a	0.72 ± 0.1 ^a	7.9 ± 0.8
Suprema 03	ND	ND	ND	4.4 ± 0.2 ^b	ND	ND
Jumbo 2010	ND	ND	ND	2.1 ± 0.2 ^d	ND	ND
Blanoro	0.4 ± 0.1 ^c	2.2 ± 0.2 ^b	ND	4.5 ± 0.1 ^b	0.38 ± 0.1 ^c	ND
Hoga 021	1.1 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.4 ^a	ND	3.5 ± 0.3 ^c	0.41 ± 0.1 ^c	ND
Hoga 340	1.8 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^c	0.5 ± 0.01	2.1 ± 0.2 ^d	0.38 ± 0.1 ^c	ND
ICC3421	ND	ND	ND	1.9 ± 0.1 ^d	0.34 ± 0.1 ^c	ND
DESI						
ICC6306	4.9 ± 0.4 ^{bc}	ND	9.9 ± 1.03 ^c	ND	2.85 ± 0.1 ^b	26.2 ± 1.6 ^c
ICC3761	2.8 ± 0.1 ^{cd}	ND	8.8 ± 0.55 ^c	4.8 ± 0.3 ^d	2.73 ± 0.1 ^b	25.6 ± 0.3 ^c
ICC4418	8.2 ± 2.5 ^a	ND	14.5 ± 0.04 ^a	12.9 ± 0.2 ^a	5.50 ± 0.1 ^a	53.3 ± 0.5 ^a
ICC3512	1.9 ± 0.2 ^d	ND	6.1 ± 0.02 ^d	5.7 ± .01 ^c	1.82 ± 0.1 ^d	19.4 ± 0.4 ^d
ICC5383	1.3 ± 0.1 ^d	ND	8.9 ± 0.18 ^c	ND	2.25 ± 0.2 ^c	21.9 ± 2.1 ^{cd}
ICC13124	ND	ND	4.8 ± 0.28 ^d	ND	1.25 ± 0.1 ^e	12.3 ± 0.9 ^e
ICC14872	ND	ND	5.4 ± 0.43 ^d	9.2 ± 0.3 ^b	1.55 ± 0.1 ^{de}	13.5 ± 1.2 ^e
ICC5613	5.9 ± 0.7 ^{ab}	ND	12.3 ± 0.54 ^b	ND	2.95 ± 0.1 ^b	31.6 ± 2.9 ^b
LOD	0.0011	0.0012	0.003	0.0032	0.0003	0.0017

¹µg equivalentes de aglicona/g de muestra bs. ²µg/ g de muestra bs. ND, No detectado. LOD, Limite de detección (mg/mL). Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas (p <0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

El flavonol rutina se encontró solamente en tres genotipos kabuli: Blanoro (0.26 $\mu\text{g/g}$), Hoga 021 (0.62 $\mu\text{g/g}$) y Hoga 340 (0.66 $\mu\text{g/g}$). Estos valores son similares a los reportados por Aguilera y col (2011a) para el genotipo Bco. Sin. 92 (0.52 $\mu\text{g/g}$). El hecho de que en este estudio no se encontrara el compuesto rutina en el genotipo Blanco Sinaloa 92 podría atribuirse a las condiciones de cultivo y extracción. Fratianni y col (2014) y Wang y col (2016) no detectaron rutina en garbanzo pero si en otras leguminosas como lenteja y frijol negro.

La isoflavona genisteína hexósido se encontró en cuatro genotipos kabuli (Progreso 95, Blanoro, Hoga 021 y Hoga 340) en los que varió de 0.4 a 1.8 $\mu\text{g/g}$, mientras que en los materiales tipo desi se encontró en 6 genotipos con valores de 1.3 a 8.2 $\mu\text{g/g}$ (Cuadro 15), los cuales son cercanos a lo reportado por Aguilera y col (2011a) en garbanzo cv. Castellano (13.26 $\mu\text{g/g}$). Las isoflavonas como genisteína han tomado importancia hoy en día debido a sus propiedades antidiabéticas (Li y col, 2015).

El flavonol quercetina se detectó en todos los genotipos desi (4.8-14.5 $\mu\text{g/g}$), mientras que en los tipo kabuli solo se detectó en Hoga 340 (0.5 $\mu\text{g/g}$) y su valor fue similar al reportado por Aguilera y col (2011a) para un derivado de quercetina (0.52 $\mu\text{g/g}$) en garbanzo Blanco Sinaloa. Estos resultados corresponden con lo observado por Magalhaes y col (2017) quienes detectaron derivados de quercetina en un genotipo desi pero no en genotipos kabuli.

La isoflavona biocanina A fue detectada en todos los genotipos kabuli (0.6-8.1 $\mu\text{g/g}$), mientras que en los desi solo se encontró en 4 genotipos (4.8-12.9 $\mu\text{g/g}$) (Cuadro 15). Estos valores son cercanos al reportado por Aguilera y col (2011a) en garbanzo variedad Castellano (16.14 $\mu\text{g/g}$).

El compuesto kaempferol se detectó en 6 genotipos kabuli (Blanco Sinaloa 92, Progreso 95, Blanoro, Hoga 021, Hoga 340 y ICC3421) y su contenido varió de 0.34 a 0.72 $\mu\text{g/g}$, valores similares al reportado por Aguilera y col (2011a) para un derivado de kaempferol en garbanzo variedad Blanco Sinaloa (0.60 $\mu\text{g/g}$). En cuanto a los garbanzos desi, el kaempferol se detectó en todos los genotipos y su concentración varió de 1.25 a 5.50 $\mu\text{g/g}$, valores similares a los reportados por

Stanisavljević y col (2015) en la testa de cuatro variedades de chícharo (3.77 - 6.49 µg/g).

La isoramnetina se detectó en todos los genotipos desi (12.3-31.6 µg/g), mientras que en los kabuli solo se detectó en el genotipo Progreso 95 (7.9 µg/g). Su derivado isoramnetín 3-*O*-β-*D*-glucopiranosido fue identificado en 4 genotipos kabuli (Progreso 95, Blanoro, Hoga 021 y Hoga 340) con contenidos de 1.58 a 3.02 µg/g, pero no fue detectado en los genotipos desi.

Las diferencias cuali y cuantitativas encontradas con respecto a lo reportado en garbanzo en estudios previos, pueden ser atribuidas a diferencias en la base genética, en las condiciones de cultivo y en los métodos de extracción. No obstante, la gran variabilidad de fenólicos observadas en los materiales estudiados refleja su amplia diversidad genética y sugiere que representan una buena fuente de antioxidantes para el mejoramiento de garbanzo.

5 Asociación entre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos metanólicos

Al contrastar el contenido de fenólicos totales con las AA de cada uno de los métodos evaluados se observaron correlaciones positivas altamente significativas: DPPH ($r=0.949$, $p<0.001$), ABTS ($r=0.928$, $p<0.001$) y FRAP ($r=0.988$, $p<0.001$). Esto concuerda con las correlaciones reportadas previamente por Zhao y col (2014) para DPPH ($r=0.830$, $p<0.01$), Han y Baik (2008) para ABTS ($r=0.934$, $p<0.01$) y Segev y col (2010) para FRAP ($r=0.820$, $P<0.01$) en garbanzo y sugiere que los fenólicos son los principales compuestos responsables de la AA en los extractos metanólicos. El método de FRAP mostró la correlación positiva más elevada con el contenido de fenólicos, lo cual puede deberse a que el método para la cuantificación de fenólicos totales consiste en una reacción de óxido-reducción.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró las similitudes y diferencias entre los genotipos de garbanzo (Fig. 16). Dos componentes explicaron el 89.66% de la variación total observada en el contenido de fenólicos y la AA. El primer componente (PC1, 57.16%) fue asociado con la AA, fenólicos totales, flavonoles e isoflavonas, mientras que el segundo se asoció con el contenido de ácidos

hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y flavan-3-oles (PC2, 32.5%). Todos los genotipos desí estuvieron en el plano positivo de PC1, lo que corresponde con sus valores más altos de AA y contenido de flavonoides. Por el contrario, los genotipos kabuli estuvieron en el plano negativo de PC1. Basado en este análisis, los mejores genotipos de garbanzo fueron ICC 4418, ICC 6306 e ICC 3761, los cuales se localizaron en el cuadrante positivo de ambos componentes principales; estos genotipos con granos de color negro mostraron las mayores AA y contenido de isoflavonas y flavonoles. Algunos genotipos con granos de color claro (i.e. Surutato 77, Bco. Sin. 92, Blanoro e ICC3421) también resultaron prometedores ya que mostraron los mayores valores de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y flavan-3-oles.

6 Actividad antioxidante de los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos

Los compuestos fenólicos mayoritarios se evaluaron primero a la misma concentración encontrada en el extracto del genotipo ICC4418 para determinar su contribución a la AA observada en dicho extracto (Cuadro 16). Se seleccionaron como compuestos fenólicos mayoritarios al ácido sinápico (aglicona de ácido sinápico hexósido), ácido gálico, isoramnetina, catequina, miricetina y quercetina, los cuales representan el 70.1% de la suma de las concentraciones molares de todos los compuestos identificados en el extracto (Cuadros 14 y 15).

El ácido gálico (531.6 $\mu\text{mol} / \text{L}$) mostró los valores de AA más altos por ABTS y FRAP, mientras que los flavonoles miricetina (64.3 $\mu\text{mol} / \text{L}$) y quercetina (44.5 $\mu\text{mol} / \text{L}$) mostraron los valores más bajos para ABTS y FRAP, respectivamente; los valores de AA de estos compuestos correspondieron con su concentración en el extracto. Suponiendo un efecto aditivo, la suma de las actividades individuales representó 34.3%, 69.8% y 47.0% de la AA observada en el extracto por ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente. Este resultado podría deberse a que otros compuestos fenólicos minoritarios en el extracto contribuyen de manera importante a la AA, así como a la existencia de interacciones entre los compuestos involucrados.

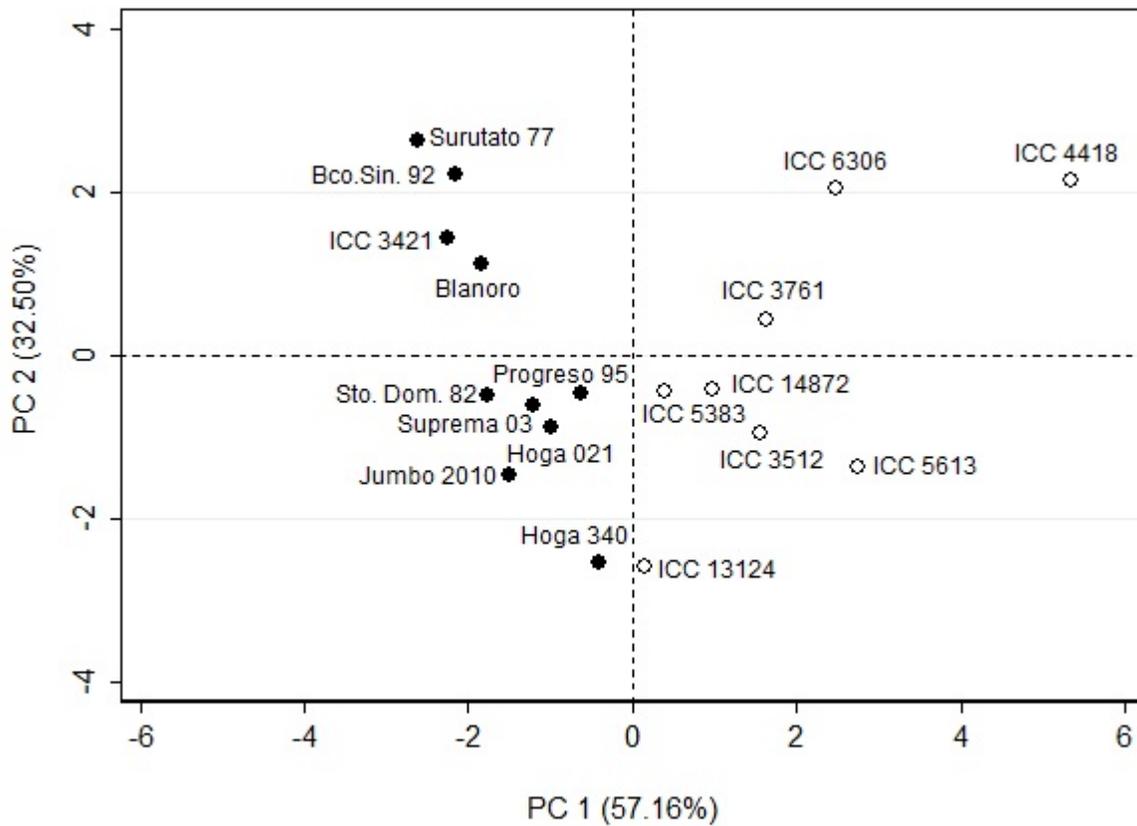


Fig 16. Análisis de componentes principales de 18 genotipos de garbanzo usando la AA de los extractos metanólicos y el contenido de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles, isoflavonas y flavonoles. Kabuli (círculos negros) y desi (círculos blancos).

Cuadro 16. Actividad antioxidante de estándares de compuestos fenólicos evaluados a la concentración encontrada en el extracto metanólico de ICC 4418 y a 50 μM

Compuesto	ABTS ($\mu\text{mol ET/L}$)		DPPH ($\mu\text{mol ET/L}$)		FRAP ($\mu\text{mol ET/L}$)	
	Extracto ¹	50 μM	Extracto ¹	50 μM	Extracto ¹	50 μM
Ácido sinápico² (715.7 $\mu\text{mol/L}$)	1047.1 \pm 44.5	66.2 \pm 5.6	5953.5 \pm 268.8	416.3 \pm 18.6	972.1 \pm 5.3	102.8 \pm 19.2
Ácido gálico (531.6 $\mu\text{mol/L}$)	3952.6 \pm 95.8	392.6 \pm 4.9	3670.3 \pm 63.3	331.2 \pm 8.3	3057.4 \pm 41.2	334.7 \pm 11.6
Isoramnetina (156.3 $\mu\text{mol/L}$)	788.6 \pm 2.6	414.9 \pm 6.1	316.7 \pm 8.0	102.6 \pm 5.2	344.1 \pm 2.8	210.5 \pm 3.8
Catequina (142.6 $\mu\text{mol/L}$)	1083.1 \pm 19.2	323.0 \pm 4.8	379.1 \pm 7.5	140.0 \pm 5.4	290.3 \pm 3.5	145.9 \pm 7.4
Miricetina (64.3 $\mu\text{mol/L}$)	456.8 \pm 9.4	346.7 \pm 4.7	201.9 \pm 6.1	177.4 \pm 5.8	243.2 \pm 6.3	182.3 \pm 6.0
Quercetina (44.5 $\mu\text{mol/L}$)	397.1 \pm 6.0	410.9 \pm 5.3	204.9 \pm 6.1	226.1 \pm 6.4	259.5 \pm 4.0	279.3 \pm 7.7

¹Compuestos individuales evaluados a la concentración del extracto indicada entre paréntesis. ²Aglicona de ácido sinápico hexósido. ET= Equivalentes de Trolox.

La AA también se evaluó utilizando concentraciones equimolares (50 $\mu\text{mol} / \text{L}$) para cada compuesto (Cuadro 16). En estas condiciones, el orden para los valores de AA por ABTS fue isoramnetina > quercetina > ácido gálico > miricetina > catequina > ácido sinápico; para DPPH fue ácido sinápico > ácido gálico > quercetina > miricetina > catequina > isoramnetina; para FRAP fue ácido gálico > quercetina > isoramnetina > miricetina > catequina > ácido sinápico. Zhang y col (2011a) evaluaron la AA de varios flavonoides con los mismos ensayos y encontraron resultados similares.

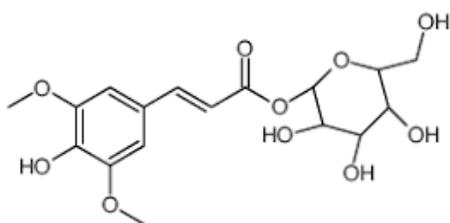
Las interacciones entre cuatro compuestos fenólicos representativos (ácido gálico, catequina, isoramnetina y quercetina) se evaluaron a concentraciones equimolares (50 $\mu\text{mol} / \text{L}$). En ABTS y DPPH, todas las combinaciones que incluyeron el ácido gálico mostraron efectos sinérgicos, excepto la mezcla ácido gálico-isoramnetina-catequina que mostró un efecto aditivo por ABTS (Cuadro 17). Las combinaciones de catequina con cada flavonol (quercetina e isoramnetina) fueron antagónicas por ABTS y aditivas por DPPH; la adición de ácido gálico a estas mezclas resultó en efectos aditivos y sinérgicos. El efecto sinérgico de la combinación equimolar de quercetina e isoramnetina por DPPH fue observado previamente por Wang y col (2015b). El ensayo de FRAP indicó interacciones antagónicas para todas las combinaciones posibles de los cuatro compuestos, lo que sugiere que el mecanismo de transferencia de electrones de este ensayo favorece la regeneración de antioxidantes débiles por compuestos más eficientes (Peyrat-Maillard y col, 2003).

La inactivación directa de radicales por compuestos antioxidantes ha sido asociada principalmente con dos mecanismos, transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia de electrones. Estos mecanismos también pueden ocurrir de manera paralela o secuencial, y el dominante será determinado principalmente por la estructura (Fig. 17) y propiedades del antioxidante (Prior y col, 2005). En flavonoides la presencia del grupo *orto*-dihidroxi (catecol) en el anillo B parece ser esencial para una alta actividad, mientras que la presencia de la molécula pirogalol o el grupo metoxilo en una posición inmediata a un hidroxilo disminuye la AA (Zhang y col, 2011a).

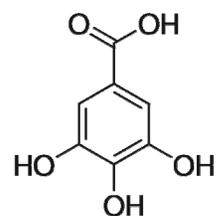
Cuadro 17. Interacciones antioxidantes entre los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos

Mezcla (50 µmol/ L)	ABTS (50 µmol ET/ L)			DPPH (50 µmol ET/ L)			FRAP (50 µmol ET/ L)		
	Observado	Esperado	Efecto	Observado	Esperado	Efecto	Observado	Esperado	Efecto
Ácido gálico- Isoramnetina	1132.6 ± 43.3 ^a	807.5 ± 10.9 ^b	Sinérgico	986.0 ± 17.4 ^a	433.8 ± 12.6 ^b	Sinergico	250.3 ± 55.3 ^b	545.2 ± 15.3 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Catequina	948.1 ± 60.3 ^a	715.7 ± 9.5 ^b	Sinérgico	1053.6 ± 35.9 ^a	471.2 ± 13.1 ^b	Sinergico	325.4 ± 40.0 ^b	480.6 ± 18.4 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Quercetina	1311.3 ± 13.7 ^a	803.6 ± 10.2 ^b	Sinérgico	1111.1 ± 32.5 ^a	557.3 ± 14.6 ^b	Sinergico	471.2 ± 38.6 ^b	614.0 ± 19.2 ^a	Antagónico
Isoramnetina- Catequina	484.3 ± 44.5 ^b	737.9 ± 10.2 ^a	Antagónico	257.2 ± 2.2 ^a	242.6 ± 10.6 ^a	Aditivo	133.0 ± 12.4 ^b	356.4 ± 10.6 ^a	Antagónico
Isoramnetina- Quercetina	771.6 ± 23.2 ^b	825.8 ± 11.3 ^a	Antagónico	364.0 ± 2.5 ^a	328.6 ± 11.3 ^b	Sinergico	321.5 ± 15.2 ^b	489.8 ± 11.4 ^a	Antagónico
Catequina- Quercetina	634.6 ± 52.4 ^b	734.0 ± 9.9 ^a	Antagónico	353.3 ± 4.4 ^b	366.0 ± 11.7 ^a	Aditivo	315.1 ± 11.0 ^b	425.2 ± 14.8 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Isoramnetina- Catequina	1155.0 ± 4.3 ^a	1130.5 ± 15.2 ^a	Aditivo	1152.3 ± 21.8 ^a	573.8 ± 17.8 ^b	Sinergico	476.4 ± 35.5 ^b	691.1 ± 22.0 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Isoramnetina- Quercetina	1528.0 ± 113.0 ^a	1218.4 ± 16.2 ^b	Sinérgico	1197.5 ± 17.2 ^a	659.9 ± 19.0 ^b	Sinergico	583.0 ± 40.6 ^b	824.5 ± 22.9 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Catequina- Quercetina	1513.6 ± 26.5 ^a	1126.6 ± 14.8 ^b	Sinérgico	1259.0 ± 10.8 ^a	697.3 ± 19.5 ^b	Sinergico	650.6 ± 28.6 ^b	759.9 ± 26.1 ^a	Antagónico
Catequina- Isoramnetina- Quercetina	1030.3 ± 13.7 ^b	1148.8 ± 15.6 ^a	Antagónico	802.0 ± 24.0 ^a	468.6 ± 16.6 ^b	Sinergico	399.9 ± 51.8 ^b	635.7 ± 18.2 ^a	Antagónico
Ácido gálico- Isoramnetina- Catequina- Quercetina	1702.1 ± 60.8 ^a	1541.5 ± 20.5 ^b	Sinérgico	1243.0 ± 23.5 ^a	799.9 ± 24.2 ^b	Sinergico	838.7 ± 30.3 ^b	970.4 ± 29.7 ^a	Antagónico

ET= Equivalente de trolox. Diferente letra entre los valores observados y esperados para un mismo ensayo indican diferencias significativas (p <0.05) de acuerdo con una prueba t.

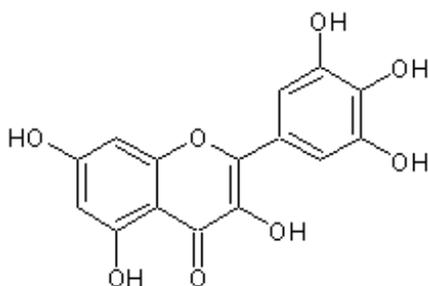


Ácido sinápico hexósido*



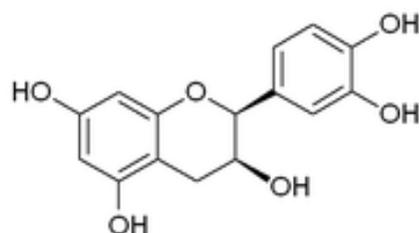
Ácido gálico

PI: 145.51 kJ/ mol
BDE: 73.54 kJ/ mol



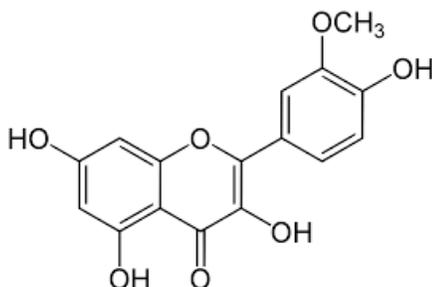
Miricetina

PI: 555.75 kJ/ mol
BDE: 306.01 kJ/ mol



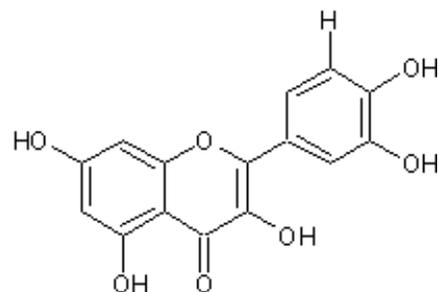
Catequina

PI: 575.05 kJ/ mol
BDE: 306.47 kJ/ mol



Isoramnetina

PI: 554.79 kJ/ mol
BDE: 310.11 kJ/ mol



Quercetina

PI: 553.82 kJ/ mol
BDE: 299.28 kJ/ mol

Fig 17. Estructuras y características químicas de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos de garbanzo. PI: Potencial de ionización; BDE: Entalpía de disociación de enlace de grupos OH. *No se encontraron valores de PI y BDE para el ácido sinápico hexósido.

Adaptado de Zhang y col (2011a) y Saqib y col (2015).

La AA observada por DPPH mostro una relación inversa con la energía de disociación de enlace (BDE) de los compuestos: el orden de BDE de los compuestos es isoramnetina > catequina > miricetina > quercetina > ácido galico (Zhang y col, 2011a; Saqib y col, 2015), esto corresponde con el orden de AA observado para los flavonoides por DPPH (Cuadro 15), por lo que se llegó a la conclusión de que la acción de captación de radicales de estos compuestos en el ensayo DPPH está más cerca de un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno. El potencial de ionización de los compuestos evaluados muestra una asociación directa con la AA registrada en el ensayo de FRAP: el orden de los potenciales de ionización de los flavonoides es catequina > miricetina > isoramnetina > quercetina (Zhang y col, 2011a), este orden corresponde al de la AA en el ensayo FRAP, confirmando que el mecanismo antioxidante predominante en el ensayo FRAP es la transferencia de electrones. En ABTS, la inactivación del radical parece involucrar mecanismos de reacción complejos, ya que la AA de los compuestos no mostró relación con sus estructuras o propiedades.

B CONTENIDO Y PERFIL DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE GARBANZO

1 Contenido de proteína total, albuminas y globulinas

Las proteínas de garbanzo han sido reconocidas alrededor del mundo debido a su alta biodisponibilidad y alto valor biológico (Ladizinsky, 1995). En el Cuadro 18 se muestra el contenido de proteína total, albúminas y globulinas de los 18 genotipos de garbanzo estudiados. Considerando la proteína total, los valores fueron similares para los genotipos kabuli (22.17 g/ 100 g en Bco. Sin. 92 a 29.95 g/ 100 g en ICC3421) y desi (21.49 g/ 100 g en ICC14872 a 28.86 g/ 100 g en ICC3512). Estos valores se encuentran dentro de lo reportado por Wang y col (2017) (15.1-31.6 g/ 100 g) y Bhagyawant y col (2018) (4.6-33.9 g/ 100 g) en dos colecciones de garbanzo de ICRISAT; sin embargo, algunos fueron mayores a los reportados por Jadhav y col (2015) en 187 genotipos de garbanzo representativos de la diversidad de garbanzos tipo desi y kabuli (13.3-26.8 g/ 100 g).

Cuadro 18. Contenido de proteína total, albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	Proteína total (g/100 g de harina)	Globulinas (g/100 g de proteína)	Albúminas (g/100 g de proteína)
KABULI			
Surutato 77	25.28 ± 0.6 ^c	47.58 ± 4.7 ^{ab}	17.45 ± 1.6 ^{bc}
Sto. Dom. 82	23.10 ± 0.5 ^{de}	44.87 ± 1.6 ^{abc}	14.98 ± 1.2 ^{bcd}
Bco. Sin. 92	22.17 ± 0.5 ^e	52.16 ± 1.7 ^a	14.43 ± 0.8 ^{cde}
Progreso 95	29.68 ± 0.3 ^a	34.93 ± 3.7 ^c	11.23 ± 0.4 ^e
Suprema 03	24.70 ± 0.8 ^{cd}	47.04 ± 2.5 ^{ab}	11.75 ± 0.9 ^{de}
Jumbo 2010	24.02 ± 0.7 ^{cd}	46.66 ± 6.1 ^{ab}	17.59 ± 1.2 ^{bc}
Blanoro	28.01 ± 0.5 ^b	41.31 ± 2.2 ^{bc}	12.29 ± 0.3 ^{de}
Hoga 021	24.24 ± 0.5 ^{cd}	50.44 ± 2.3 ^{ab}	16.25 ± 0.2 ^{bc}
Hoga 340	21.97 ± 0.8 ^e	51.34 ± 5.0 ^{ab}	18.13 ± 1.3 ^b
ICC3421	29.52 ± 0.6 ^{ab}	35.44 ± 1.0 ^c	29.35 ± 1.5 ^a
Promedio	25.46^A	45.18^A	16.35^A
DESI			
ICC6306	24.94 ± 0.3 ^c	44.74 ± 0.7 ^{bc}	16.15 ± 0.6 ^b
ICC3761	22.38 ± 0.4 ^d	51.35 ± 1.3 ^a	17.13 ± 1.3 ^{ab}
ICC4418	24.74 ± 0.6 ^c	47.37 ± 2.4 ^{ab}	16.73 ± 0.3 ^{ab}
ICC3512	28.86 ± 0.7 ^a	33.12 ± 0.7 ^e	12.41 ± 0.7 ^c
ICC5383	27.72 ± 0.3 ^{ab}	39.97 ± 0.9 ^{cd}	13.47 ± 0.8 ^c
ICC13124	25.63 ± 0.4 ^c	35.12 ± 0.5 ^{de}	13.48 ± 1.0 ^c
ICC14872	21.49 ± 0.5 ^d	47.15 ± 3.7 ^{ab}	18.66 ± 0.9 ^a
ICC5613	27.22 ± 0.2 ^b	37.67 ± 1.3 ^{de}	12.84 ± 0.2 ^c
Promedio	25.37^A	42.06^A	15.11^A

Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio de cada tipo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con una prueba t.

Se ha reportado que las globulinas representan la fracción principal de proteínas en el grano de garbanzo (57%), seguido de las glutelinas (18%), albúminas (12%) y prolaminas (3%) (Singh y Jambunathan, 1982). Sin embargo, otros estudios han encontrado que la fracción de albúminas puede incrementarse considerablemente (48%) dependiendo de las condiciones de extracción (Liu y col, 2008). En este sentido, en el presente estudio se realizó la extracción y cuantificación de globulinas y albúminas por ser las principales fracciones reportadas en garbanzo.

En general, los genotipos kabuli (45.18 g/ 100 g) presentaron mayor contenido de globulinas que los genotipos desi (42.06 g/ 100 g) (Cuadro 18). En esta fracción se observaron rangos de 34.93 (Progreso 95) a 52.16 g/ 100 g (Bco. Sin. 92) para kabuli y de 33.12 (ICC3512) a 51.35 g/ 100 g (ICC3761) para desi. Estos valores son menores a los reportados por Dhawan y col (1991) en 6 genotipos de garbanzo tipo kabuli (53.44 a 59.06 g/ 100g) y por Tavano y col (2008) para el cultivar IAC-Marrocos (47.85 g/ 100 g), pero se encuentran dentro del rango reportado por Singh y col (2008a) para cinco genotipos de garbanzo de la india (39.80 a 64.21 g /100 g).

El contenido de albúminas de los genotipos kabuli varió de 11.23 (Progreso 95) a 29.35 g/ 100 g (ICC3421), mientras que en los desi varió de 12.41 (ICC3512) a 18.66 g/ 100 g (ICC14872); sin embargo, a pesar del rango tan amplio observado en los genotipos desi no se observaron diferencias entre los contenidos promedio de los dos tipos de garbanzo (15.11 y 16.35 g/ 100 g para kabuli y desi, respectivamente). Singh y Jambunathan (1982) reportaron un contenido de 12.5 g/ 100 g en la fracción de albúminas del genotipo de garbanzo G-130, mientras que Singh y col (2008a) reportaron valores de 11.63 a 24.23 g /100 g en garbanzo de la india; los valores reportados por estos autores coinciden con los valores obtenidos en el presente estudio.

La variabilidad observada en el contenido de proteína total, albúminas y globulinas en los genotipos de garbanzo sugiere que representan una buena fuente de genes para mejorar estas características.

2 Perfil electroforético de las principales proteínas de garbanzo

a Perfil de globulinas

El análisis electroforético de la fracción de globulinas extraídas de los 18 genotipos de garbanzo mostró siete bandas como proteínas del tipo vicilina, leguminas y resistencia a enfermedades (Fig. 18).

Tres de las bandas fueron identificadas como proteínas del tipo legumina 11S (43.0, 39.0 y 27.4 kDa) (Cuadro 19). La legumina 11S está formada por 6 subunidades oligoméricas unidas por enlaces no covalentes, cada subunidad da lugar a una cadena ácida (legumina α) de 37-40 kDa y una básica (legumina β) de 24-27 kDa (Sánchez-Vioque y col, 1999). Chang y col (2011) identificaron dos subunidades ácidas de la proteína 11S (40.7 y 38.0 kDa) en garbanzo que coincide con los pesos moleculares encontrados en este estudio para las proteínas legumina A2 (43.0 kDa) y legumina (39.0 kDa). Ellos también reportaron dos bandas correspondientes a la subunidad básica de 26.5 y 25.2 kDa; en este estudio solo se observó la presencia de una sola banda para la subunidad básica (27.4 kDa) y fue identificada como legumina (Cuadro 19).

La secuencia aminoacídica de las subunidades ácida y básica de la proteína legumina presentan una homología del 12%, pero en las bases de datos solo se encuentran reportadas como parte de la proteína legumina, por lo que las búsquedas para identificar las bandas de proteínas encontradas para ambas subunidades suelen dar como resultado la misma secuencia reportada en la base de datos UniProt (Q9SMJ4). A pesar de ello, es muy probable que la banda de 39.0 kDa corresponda a la subunidad ácida, ya que los péptidos identificados en esa banda se alinearon con dicha subunidad (Fig. 19).

La proteína vicilina 7S está formada por tres oligopéptidos que pueden ser iguales o diferentes (40-70 kDa); bajo condiciones desnaturizantes estas subunidades se separan en 3 polipéptidos (Casey y col, 1993). Los pesos moleculares encontrados en el presente estudio para las subunidades de proteínas tipo vicilina (49.6, 47.3, y 34.3 kDa) (Cuadro 19) fueron similares al patrón reportado para las proteínas vicilina 7S de chícharo (50, 35, 19 kDa) por Guéguen (1991).

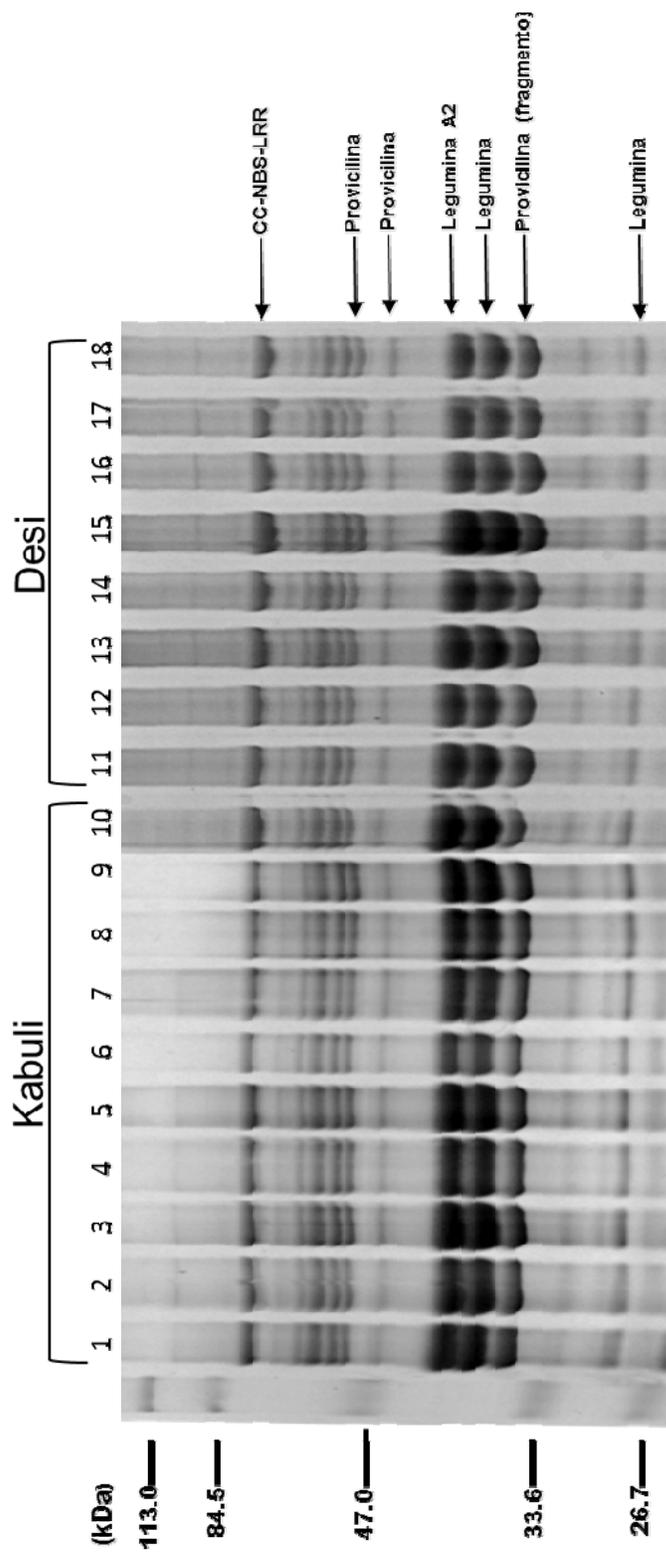


Fig 18. Separación por SDS-PAGE de la fracción globulinas de garbanzo. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular (kDa). Carriles: 1, Bco. Sin. 92; 2, Blanco; 3, Hoga 021; 4, Hoga 340; 5, Jumbo 2010; 6, Suprema 03; 7, Progreso 95; 8, Sto. Dom. 82; 9, Surutato 77; 10, ICC 3421; 11, ICC 6306; 12, ICC 3761; 13, ICC 4418; 14, ICC 3512; 15, ICC 5383; 16, ICC 13124; 17, ICC 14872; 18, ICC 5613

Cuadro 19. Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de la fracción de globulinas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

ID	Identidad	PM Exp.	PM Teórico	% cobertura	Péptidos que coincidieron
V5UQI4	Proteína de resistencia a enfermedades CC-NBG-LRR (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	74.1 kDa	90.5 kDa	23.52	(21) NKVIEMVGRK SGVELSHKVLATSR DLALNLSNR VDASNR
Q304D4	Provicilina (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	49.6 kDa	51.4 kDa	28.26	(17) SRNPIYSNK EQIEELSK EQIEELSKNAKSSSK FSLPDNENDLKLTR
Q304D4	Provicilina (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	47.3 kDa	51.4 kDa	37.31	(22) SVSSESEPFNLR EQIEELSK TNVTVFVLEKSLK NPIYSNK
P15838	Legumina A2 (OS= <i>Pisum sativum</i>)	43.0 kDa	59.2 kDa	25.38	(18) RFYLAGNHEQEFLR NEDEEKGAIVK RDYLEDAFNVNR ATLQHNALR
Q9SMJ4	Legumina (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	39.0 kDa	56.2 kDa	32.06	(17) RFYLAGNHEQEFLR IKSEGGLIETWNPSNK FYLAGNHEQEFLR RDFLEDALNVNR
P02855	Provicilina (Fragmento) (OS= <i>Pisum sativum</i>)	34.3 kDa	31.5 kDa	23.7	(7) FFEITPKK SVSSRSEPFNLK QSYFANAQPQQR ETRSQEIK
Q9SMJ4	Legumina (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	27.4 kDa	56.2 kDa	42.34	(30) DFLEDALNVNR RFYLAGNHEQEFLR QEEDEDEDEK GNSVFDGELEAGR

ID= Número de acceso en UniProtKB; PM= Peso Molecular. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra.

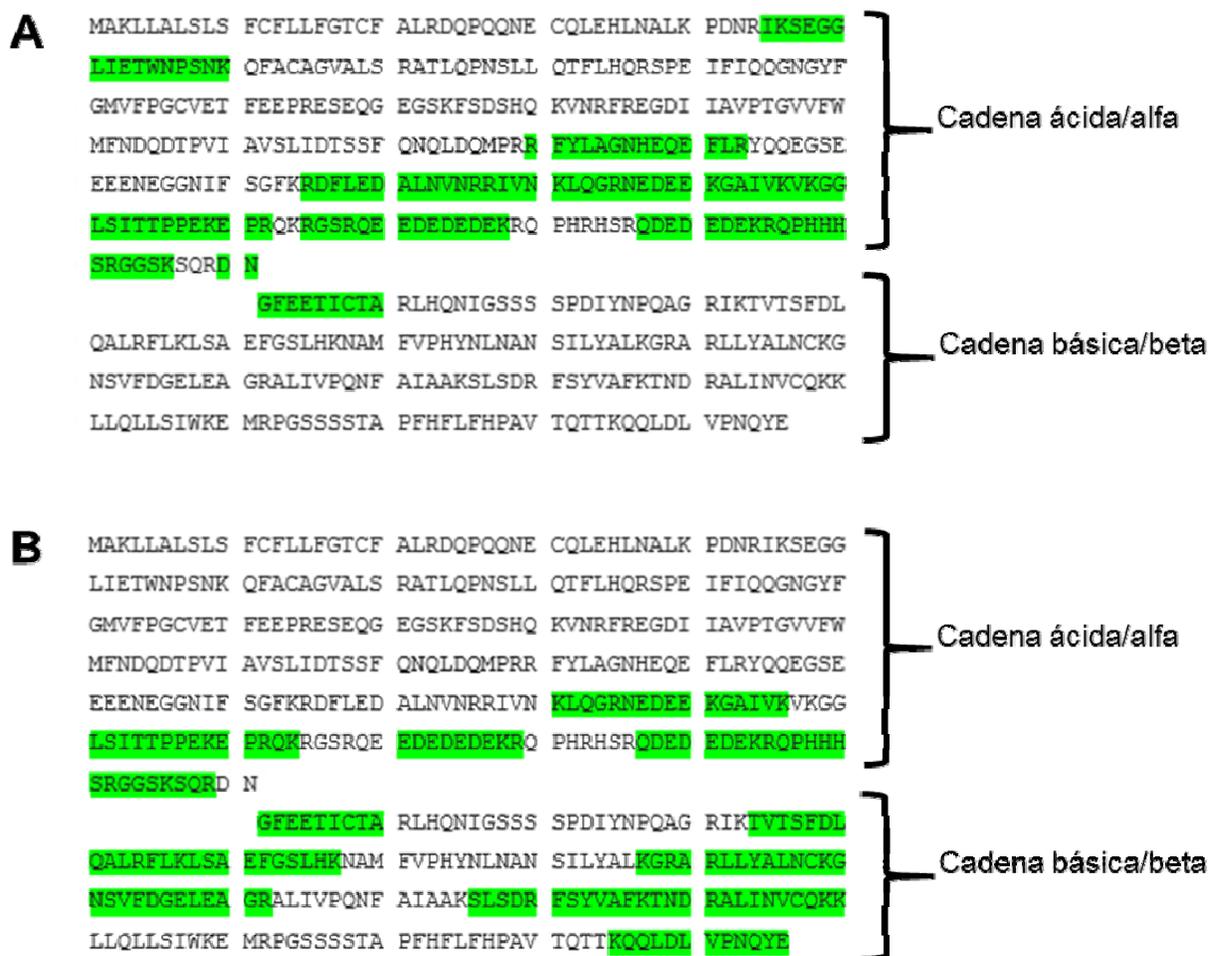


Fig 19. Alineamiento entre la secuencia de la proteína Legumina (Q9SMJ4) y los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas para las bandas de proteínas de 39.0 kDa (A) y 27.4 kDa (B). Los péptidos resaltados corresponden a los identificados.

Uno de los principales grupos de proteínas de defensa en las plantas son las que poseen un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR) (Sharma y col, 2017). La banda de 71.4 kDa de la fracción de globulinas fue identificada como una proteína NBS-LRR con un dominio de hélice superenrollada (CC-NBS-LRR) (Cuadro 19), la cual está involucrada en la defensa contra enfermedades como la plaga de *Ascochyta*, marchitamiento por *Fusarium*, moho gris y pudrición por *Sclerotium* (Martin y col, 2003; De Young y Innes, 2006; van Ooijen y col, 2007). El análisis densitométrico de las proteínas identificadas en la fracción de globulinas se muestra en el Cuadro 20, donde se observa una mayor acumulación de todas las proteínas en los genotipos kabuli. En el caso de la proteína CC-NBS-LRR se, a pesar de que se ha reportado una mayor resistencia a enfermedades y patógenos por parte de los genotipos de garbanzo tipo desi, se acumuló mayormente en los genotipos kabuli (Sharma y Muehlbauer, 2007; Sharma y col, 2017). Esto sugiere que dicha resistencia está asociada a otro tipo de proteínas o compuestos químicos como los fenólicos.

Considerando las tres subunidades identificadas como proteínas tipo vicilina, la que mostró mayor acumulación fue identificada como un fragmento de provicilina de 34.3 kDa. En general se encontró una mayor acumulación de las dos subunidades ácidas de la proteína legumina que de las vicilinas, patrón que ya ha sido observada en otras leguminosas como el chícharo (Dziuba y col, 2014).

b Perfil de albúminas

Después de las globulinas, las albúminas ocupan el segundo lugar en importancia en garbanzo y tienen mejores valores de calidad proteínica que las otras fracciones (Tavano y col, 2008). El perfil de albúminas de los genotipos de garbanzo usados en este estudio mostró 7 bandas (Fig. 20) de proteínas correspondientes a lipoxigenasa (96.2 kDa), apoproteína A1 (81.5 kDa), proteína de choque térmico (76.5 kDa), cadena larga de ribulosa bifosfato carboxilasa (66.2 kDa), proteína de 25.7 kDa (32.0 kDa), porina (30.9 kDa) y albúmina 2S (25.6 kDa) (Cuadro 21).

Cuadro 20. Análisis densitométrico de la fracción de globulinas en los 18 genotipos de garbanzo evaluados

Genotipo	CC-NBS-LRR (74.1 kDa)	Provicilina (49.6 kDa)	Provicilina (47.3 kDa)	Legumina A2 (43.0 kDa)	Legumina (37.0 kDa)	Provicilina (fragmento) (34.3 kDa)	Legumina (27.4 kDa)
KABULI							
Surutato 77	2,228.75 ^a	2,540.72 ^{ab}	2,329.86 ^a	2,779.52 ^a	2,733.22 ^a	2494.45 ^{ab}	2144.38 ^a
Sto. Dom. 82	2,242.95 ^a	2,550.52 ^{ab}	2,327.24 ^a	2,645.49 ^a	2,974.39 ^a	2519.49 ^{ab}	2143.35 ^a
Bco. Sin. 92	2,615.50 ^a	2,659.90 ^a	2,398.41 ^a	3,114.35 ^a	3,235.59 ^a	2904.63 ^{ab}	2439.71 ^a
Progreso 95	2,466.44 ^a	2,444.12 ^{ab}	2,278.00 ^a	2,622.59 ^a	3,164.40 ^a	2847.20 ^{ab}	2091.33 ^a
Suprema 03	2,596.82 ^a	2,269.57 ^b	2,049.78 ^a	2,541.60 ^a	2,762.75 ^a	2446.54 ^{ab}	1987.76 ^a
Jumbo 2010	2,402.85 ^a	2,642.09 ^a	2,251.41 ^a	2,958.63 ^a	2,957.41 ^a	2539.13 ^{ab}	2087.58 ^a
Blanoro	2,291.17 ^a	2,703.55 ^a	2,067.19 ^a	3,044.47 ^a	3,066.04 ^a	3075.65 ^a	2256.55 ^a
Hoga 021	2,262.37 ^a	2,638.97 ^a	2,405.32 ^a	3,045.91 ^a	3,229.63 ^a	2926.93 ^{ab}	2303.18 ^a
Hoga 340	2,410.63 ^a	2,655.97 ^a	2,063.71 ^a	3,009.12 ^a	3,234.34 ^a	2801.52 ^{ab}	2112.80 ^a
ICC3421	2,546.69 ^a	2,487.18 ^{ab}	2,277.94 ^a	2,720.08 ^a	2,800.08 ^a	2381.31 ^b	2241.69 ^a
Promedio	2,406.4^A	2,559.2^A	2,244.8^A	2,848.1^A	3,015.7^A	2693.6^A	2180.8^A
DESI							
ICC6306	2,288.04 ^{ab}	2,219.40 ^b	2,080.48 ^a	2,499.39 ^{ab}	2,599.27 ^a	2347.70 ^a	1967.09 ^{ab}
ICC3761	2,352.70 ^{ab}	2,287.35 ^{ab}	2,123.63 ^a	2,581.71 ^{ab}	2,631.03 ^a	2259.58 ^a	1931.58 ^{ab}
ICC4418	2,363.52 ^{ab}	2,298.15 ^{ab}	2,149.37 ^a	2,460.23 ^{ab}	2,680.43 ^a	2367.55 ^a	1931.81 ^{ab}
ICC3512	2,225.34 ^b	2,275.41 ^{ab}	2,205.75 ^a	2,688.37 ^{ab}	2,730.32 ^a	2552.61 ^a	2058.51 ^{ab}
ICC5383	2,617.98 ^a	2,538.65 ^a	2,357.82 ^a	2,819.30 ^a	2,821.29 ^a	2521.60 ^a	2206.05 ^a
ICC13124	2,391.68 ^{ab}	2,331.41 ^{ab}	2,149.62 ^a	2,486.02 ^{ab}	2,569.38 ^a	2453.06 ^a	2108.46 ^{ab}
ICC14872	1,740.43 ^c	1,691.28 ^c	1,529.94 ^b	2,307.06 ^{ab}	2,415.76 ^a	2251.25 ^a	1512.63 ^c
ICC5613	2,208.11 ^b	2,156.74 ^b	1,510.34 ^b	2,248.03 ^b	2,394.38 ^a	2220.44 ^a	1877.72 ^b
Promedio	2,273.4^B	2,224.8^B	2,013.3^B	2,511.2^B	2,605.2^B	2371.7^A	1949.2^B

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas (P<0.05) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

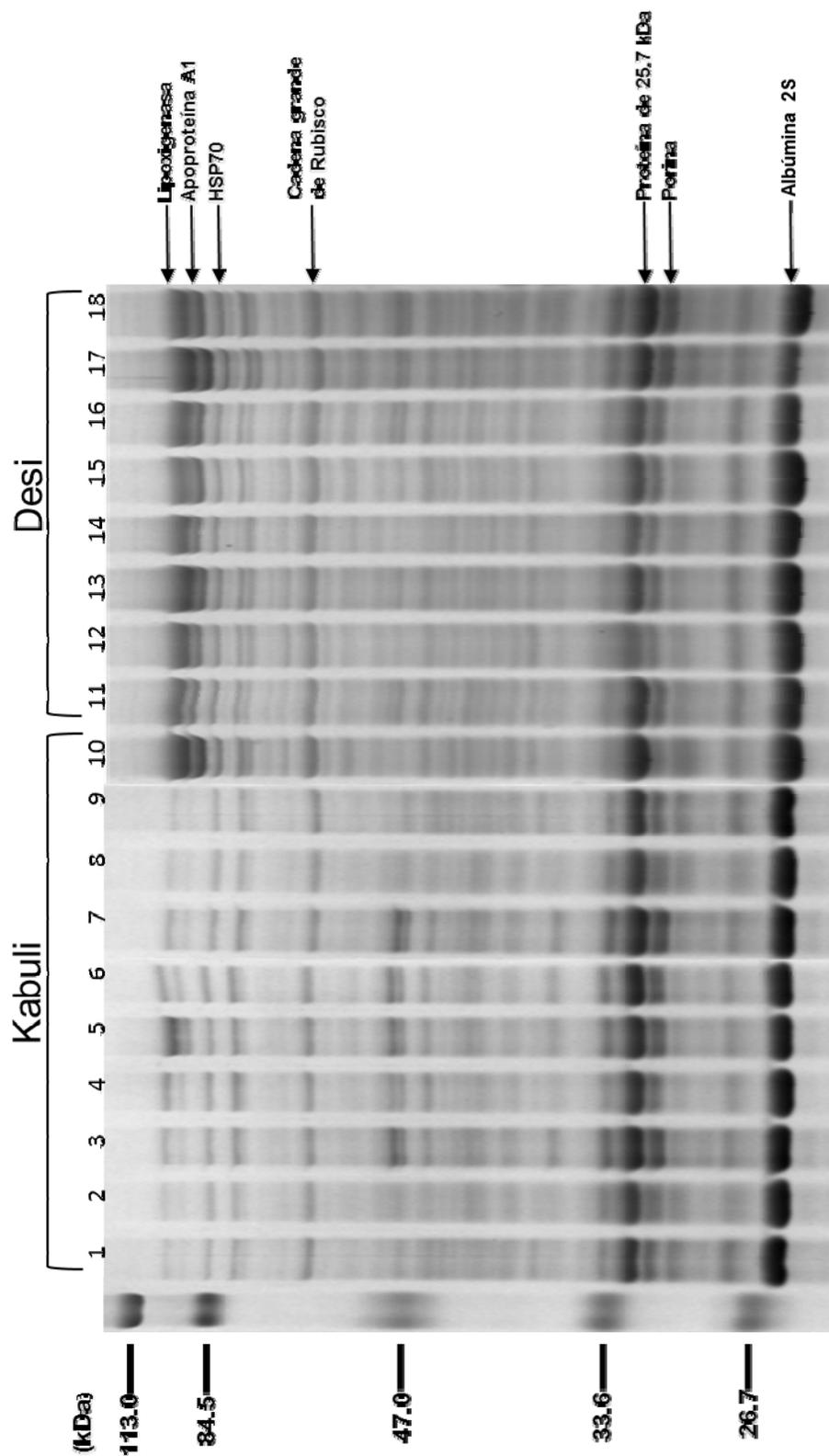


Fig 20. Separación por SDS-PAGE de la fracción albúminas de garbanzo. A la izquierda se muestran los tamaños de los marcadores de peso molecular (kDa). Carriles: 1, Bco. Sin. 92; 2, Blanco; 3, Hoga 021; 4, Hoga 340; 5, Jumbo 2010; 6, Suprema 03; 7, Progreso 95; 8, Sto. Dom. 82; 9, Surutato 77; 10, ICC 3421; 11, ICC 6306; 12, ICC 3761; 13, ICC 4418; 14, ICC 3512; 15, ICC 5383; 16, ICC 13124; 17, ICC 14872; 18, ICC 5613.

Cuadro 21. Identificación por espectrometría de masas en tándem de proteínas de la fracción de albúminas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

ID	Identidad	PM Exp.	PM Teórico	% cobertura	Péptidos que coincidieron
Q43817	Lipoxigenasa (OS= <i>Pisum sativum</i>)	96.2 kDa	97.1 kDa	25.9	(37) HASDELYLGER LLYPHYR TDASGKGLVGK DTSQKIKGTLVLMFK
B5LML6	Apoproteína A1 (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	81.5 kDa	83.2 kDa	8.2	(5) ANLGFRRFPCDGPGR GIQITSGFFQIWR LKVAPATQPRALSIVQGR EIPLPHEFILNR
Q40980	Proteína de choque térmico (hsp70) (OS= <i>Pisum sativum</i>)	76.5 kDa	71.1 kDa	47.7	(47) NSLENYAYNMR TTPSYVAFTDTER ATAGDTHLGGEDFDNR FEELNMDLFR
P04717	Cadena grande de Rubisco (OS= <i>Pisum sativum</i>)	66.2 kDa	52.7 kDa	28.6	(16) FLFCAEAIYK AMHAVIDR QKNHGMHFR NHGMHFRVLAKALR
Q9M3Y5	Proteína de 25.7 kDa (OS= <i>Cicer arietinum</i>)	32.0 kDa	25.7 kDa	44.5	(11) DLDTFLK TSKLLSEINEETIK DVSLLLDQGFK HLSDFKNLAMMFK
P42054	Porina (OS= <i>Pisum sativum</i>)	30.9 kDa	29.6 kDa	32.9	(10) MVKGPGLYTDIGK SAKIGLSLAKP AIEKSAKIGLSLAKP AILSFKVPEQTSQK
P08688	Albumina 2S (OS= <i>Pisum sativum</i>)	25.6 kDa	26.2 kDa	49.78	(17) FCALIDYAPHSNK IILGPK GKEVYLFK GKEVYLFKGDQYAR

ID= Numero de acceso en UniProtKB; PM= Peso Molecular. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra.

La enzima lipoxigenasa (96.2 kDa) está involucrada en diversos aspectos de la fisiología de la planta, incluido el crecimiento y el desarrollo, la resistencia a plagas y la senescencia o respuesta a heridas (Hilbers y col, 1994). La lipoxigenasa también participa en la degradación de ácidos grasos poliinsaturados; específicamente utiliza como sustrato a los ácidos linolénico y linoleico, jugando un papel clave en la regulación ya que el producto final de la vía oxidativa en la que participan origina el ácido jasmónico, responsable de la activación de genes durante la respuesta a daños en la planta (Baysal 2007). Esto coincide con el hecho de que los genotipos tipo desi fueron los que presentaron una mayor acumulación de lipoxigenasa, los cuales a su vez son los que generalmente presentan mayor resistencia a estrés como ataque de patógenos (Cuadro 22).

La banda de 81.5 kDa fue identificada como apoproteína A1 del fotosistema I. Esta enzima se une a la clorofila P700, el principal donante de electrones del fotosistema I (Jansen y col, 2008). La apoproteína A1 es una plastocianina-ferredoxina oxidoreductasa que convierte la energía de un fotón en una separación de carga eléctrica que inicia el flujo de electrones hacia los aceptores A₀ (clorofila aceptora de electrones) y A₁ (filoquinona) (Nelson y Cox, 2009). Esta proteína se acumuló mayormente en los genotipos desi.

La banda de proteína de 76.5 kDa corresponde a una proteína de choque térmico (HSP70), las HSP70 forman una familia de proteínas que son inducidas por estrés ambiental para proteger o ayudar a reparar el daño generado en la planta, actuando como chaperonas moleculares (Sabehat y col, 1998; Wahid y col, 2007); en particular, estas proteínas evitan que las proteínas recién sintetizadas formen agregados y propician su plegamiento adecuado durante su transferencia a su ubicación final (Sung y col, 2001). La proteína de 76.5 kDa presentó mayor acumulación en los genotipos desi, coincidiendo con el hecho de que estos son menos susceptibles a los cambios bruscos de temperatura con respecto a los genotipos kabuli (Kemal y col, 2017).

Cuadro 22. Análisis densitométrico de la fracción de albúminas en los 18 genotipos de garbanzo evaluados

Genotipo	Lipopigmentosa (96.2 kDa)	Apoproteína A1 (81.5 kDa)	HSP70 (76.5 kDa)	Cadena grande de Rubisco (66.2 kDa)	Proteína de 25.7 kDa (32.0 kDa)	Porina (30.9 kDa)	Albúmina 2S (25.6 kDa)
KABULI							
Surutato 77	1,497.23 ^{bc}	1,366.09 ^{bc}	1,290.11 ^{bcd}	1,663.13 ^a	2,831.51 ^{ab}	1,614.53 ^b	2,587.17 ^{ab}
Sto. Dom. 82	1,401.50 ^{cd}	1,281.59 ^{bcd}	1,247.85 ^{cde}	1,727.70 ^a	3,048.43 ^{ab}	1,930.23 ^{ab}	2,621.27 ^{ab}
Bco. Sin. 92	1,523.26 ^{bc}	1,463.42 ^b	1,451.18 ^{ab}	1,545.08 ^{ab}	3,335.60 ^a	1,983.32 ^{ab}	2,929.52 ^a
Progreso 95	1,070.40 ^f	1,068.02 ^d	1,072.46 ^e	1,205.65 ^b	2,770.42 ^{ab}	1,629.80 ^b	2,558.48 ^{ab}
Suprema 03	1,135.96 ^{ef}	1,167.95 ^{cd}	1,117.48 ^{de}	1,213.72 ^b	2,749.08 ^{ab}	2,054.12 ^{ab}	2,243.49 ^b
Jumbo 2010	1,224.21 ^{def}	1,261.10 ^{bcd}	1,186.66 ^{cde}	1,719.59 ^a	2,903.17 ^{ab}	2,293.17 ^a	2,588.84 ^{ab}
Bianoro	1,736.34 ^b	1,431.80 ^{bc}	1,372.20 ^{bc}	1,646.60 ^a	2,984.15 ^{ab}	2,172.38 ^a	2,657.83 ^{ab}
Hoga 021	1,355.19 ^{cde}	1,270.74 ^{bcd}	1,210.99 ^{cde}	1,673.64 ^a	3,038.15 ^{ab}	2,309.85 ^a	2,711.44 ^{ab}
Hoga 340	1,149.26 ^{def}	1,259.47 ^{bcd}	1,149.03 ^{de}	1,219.37 ^b	2,722.83 ^{ab}	2,143.51 ^a	2,537.86 ^{ab}
ICC3421	2,450.34 ^a	2,295.93 ^a	1,605.52 ^a	1,784.34 ^a	2,634.52 ^b	1,980.38 ^{ab}	2,463.35 ^{ab}
Promedio	1,454.3^B	1,399.9^B	1,270.3^B	1,539.8^A	2,901.7^A	2,006.2^A	2,589.9^A
DESI							
ICC6306	2,163.69 ^a	1,840.43 ^{bcd}	1,536.06 ^{ab}	1,668.90 ^{ab}	2,599.70 ^a	2,171.73 ^a	2,562.79 ^a
ICC3761	1,996.72 ^a	1,874.99 ^{abcd}	1,426.30 ^{ab}	1,528.70 ^{ab}	2,505.09 ^a	1,972.78 ^a	2,684.63 ^a
ICC4418	2,157.33 ^a	1,783.15 ^{cd}	1,414.06 ^{ab}	1,429.02 ^b	2,253.98 ^a	1,997.04 ^a	2,571.89 ^a
ICC3512	2,211.25 ^a	1,610.03 ^d	1,560.74 ^{ab}	1,537.31 ^{ab}	2,375.26 ^a	1,995.43 ^a	2,790.73 ^a
ICC5383	1,828.66 ^a	1,737.70 ^{cd}	1,357.22 ^b	1,508.18 ^b	2,239.96 ^a	1,999.14 ^a	2,630.32 ^a
ICC13124	1,891.13 ^a	2,010.69 ^{abc}	1,442.56 ^{ab}	1,544.79 ^{ab}	2,322.98 ^a	2,129.01 ^a	2,736.76 ^a
ICC14872	2,118.60 ^a	2,222.34 ^{ab}	1,431.51 ^{ab}	1,513.95 ^b	2,346.99 ^a	2,187.55 ^a	2,364.91 ^a
ICC5613	2,188.69 ^a	2,261.00 ^a	1,757.65 ^a	1,872.91 ^a	2,686.74 ^a	2,450.11 ^a	2,769.58 ^a
Promedio	2,069.5^A	1,917.5^A	1,490.7^A	1,575.4^A	2,416.3^B	2,112.8^A	2,638.9^A

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Letras diferentes para los valores promedio indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre garbanzos tipo desi y kabuli de acuerdo con una prueba t.

En el presente estudio, una banda de 66.2 kDa se identificó como la cadena grande de la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco); esta enzima está compuesta de ocho subunidades grandes de 55 kDa y ocho subunidades pequeñas de 15 kDa. Rubisco tiene una función dual: como carboxilasa, mediando la asimilación del CO₂ fotosintético, y como oxigenasa, catalizando la primera etapa de la ruta de fotorrespiración en plantas (Spreitzer y Salvucci, 2002; Andersson y Taylor, 2003). No se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de garbanzos para esta proteína.

La banda de 32.0 kDa coincidió con una proteína reportada como proteína de 25.7 kDa, la cual participa en la eliminación de aminoácidos mal posicionados en los RNA de transferencia (tRNA), hidrolizando el enlace éster entre el péptido y el tRNA. Este tipo de proteínas son también llamadas peptidil-tRNA hidrolasas (Das y Varshney, 2006; Ito y col, 2012).

La banda de 30.9 kDa correspondió a una proteína del tipo porina, las cuales se encuentran en la membrana externa de los plastidios. Las porinas forman poros/canales transmembranales que permiten el paso de moléculas hidrofílicas con un tamaño inferior a 1000 Da (Saier, 2000).

La banda de proteínas que mostró mayor acumulación tanto en los genotipos kabuli como en los desi fue la identificada como albúmina 2S (25.6 kDa), también llamada albumina PA2. Esta proteína fue reportada previamente por Clemente y col (2000) como una proteína del tipo lectina, cuya principal función es aglutinar los carbohidratos.

C PERFIL DE PÉPTIDOS Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS OBTENIDOS CON ALCALASA

1 Actividad antioxidante *in vitro* de hidrolizados de las principales proteínas de almacenamiento

Las leguminosas como el garbanzo son reconocidas por su alto contenido de proteínas, las cuales tienen alta digestibilidad y alto valor biológico (Clemente y col, 2000). A estas proteínas se les ha buscado potencial como suplementos alimenticios

que ayuden a mantener un estado de salud adecuado, por lo que existe gran interés por elaborar, caracterizar y estudiar hidrolizados proteínicos de leguminosas.

En el presente estudio se elaboraron hidrolizados con alcalasa a partir de las fracciones de albúminas y globulinas de 18 genotipos de garbanzo. La alcalasa fue seleccionada por generar *in silico* un mayor número de péptidos con AA que otras enzimas (tripsina, pepsina, pancreatina, pepsina + pancreatina) utilizadas comúnmente en la elaboración de hidrolizados proteínicos (Cuadro 23).

En general, la AA por ABTS fue mayor en la fracción de albúminas que en la de globulinas (Cuadro 24); los valores para albúminas de los genotipos kabuli oscilaron entre 197.62 (Blanoro) y 877.50 $\mu\text{mol ET/L}$ (Suprema 03); mientras que para los tipo desi fueron de 459.57 (ICC4418) a 799.4 $\mu\text{mol ET/L}$ (ICC3512). Con respecto a la fracción de globulinas, los genotipos más sobresalientes en AA por ABTS fueron progreso 95 (488.95 $\mu\text{mol ET/L}$) e ICC3761 (518.69 $\mu\text{mol ET/L}$), mientras que los genotipos con los valores más bajos fueron Blanoro (369.54 $\mu\text{mol ET/L}$) e ICC13124 (395.29 $\mu\text{mol ET/L}$). En ambas fracciones el genotipo que presentó los menores valores fue el genotipo Blanoro. Los valores obtenidos son superiores a los reportados por Medrano y del Castillo (2011) (100-250 $\mu\text{mol ET/L}$) para hidrolizados de glicinina de soya con la enzima flavourzima, pero son similares a los reportados por Esfandi y col (2019) en hidrolizados de avena con alcalasa (320-450 $\mu\text{mol ET/L}$) y Garcia-Mora y col (2016) en hidrolizados de albúminas de frijol pinto con alcalasa (240-410 $\mu\text{mol ET/L}$).

Considerando la AA por DPPH de los hidrolizados proteicos de los 18 genotipos de garbanzo (Cuadro 25), la fracción albúminas (22.99%-64.46%) presentó mayor actividad que la fracción globulinas (23.07%-28.85%). Para la fracción de albúminas, los genotipos con mayores valores antioxidantes fueron Suprema 03 (64.46%, kabuli) e ICC3512 (54.21%, desi). Mientras que en la fracción de globulinas, el genotipo kabuli más sobresaliente fue progreso 95 (28.85 %) y entre los genotipos desi no se observaron diferencias significativas (promedio = 26.73%). Los valores de AA por DPPH observados en el presente estudio corresponden con los reportados por Ghribi y col (2015) en hidrolizados de garbanzo con alcalasa (45%).

Cuadro 23. Número de péptidos antioxidantes generados por hidrólisis *in silico* a partir de las secuencias de las proteínas identificadas en la fracción de albúminas y globulinas

Proteínas	Tripsina	Pepsina	Pancreatina	Pepsina + Pancreatina	Alcalasa
Globulinas					
CC-NBS-LRR (74.1 kDa)	1	0	5	6	6
Provicilina (49.6 kDa)	3	2	2	4	2
Provicilina (47.3 kDa)	3	2	2	4	2
Legumina A2 (43.0 kDa)	0	1	3	2	1
Legumina (37.0 kDa)	0	1	0	2	2
Provicilina (frag) (34.3 kDa)	0	1	0	2	2
Legumina (27.4 kDa)	0	1	0	2	2
Albuminas					
Lipoxigenasa (96.2 kDa)	1	1	10	9	10
Apoproteína A1 (81.5 kDa)	1	0	5	5	12
HSP70 (76.5 kDa)	0	1	1	2	5
Cadena grande de Rubisco (66.2 kDa)	0	0	1	1	7
Proteína de 25.7 kDa (32.0 kDa)	0	0	0	0	0
Porina (30.9 kDa)	0	2	3	3	1
Albúmina 2S (25.6 kDa)	1	0	1	1	3
Total	10	12	33	43	55

El número de péptidos bioactivos de cada proteína se determinó ingresando las secuencias obtenidas por espectrometría de masas (Cuadros 19 y 21) en la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>).

Cuadro 24. Actividad antioxidante *in vitro* por ABTS de las fracciones de albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	Albúminas		Globulinas	
	% Inhibición	μmol ET/ L	% Inhibición	μmol ET/ L
KABULI				
Surutato 77	47.11 ± 1.3 ^c	687.38 ± 24.2 ^c	35.32 ± 1.0 ^{abc}	418.37 ± 19.9 ^{abc}
Sto. Dom. 82	50.39 ± 2.6 ^{bc}	750.27 ± 49.7 ^{bc}	37.43 ± 1.9 ^{ab}	461.43 ± 40.6 ^{ab}
Bco. Sin. 92	36.89 ± 1.6 ^{de}	491.23 ± 30.9 ^{de}	36.74 ± 0.8 ^{abc}	447.23 ± 16.9 ^{abc}
Progreso 95	51.24 ± 0.7 ^b	766.51 ± 13.5 ^b	38.78 ± 1.5 ^a	488.95 ± 30.3 ^a
Suprema 03	57.01 ± 1.1 ^a	877.50 ± 14.2 ^a	33.96 ± 0.8 ^{bc}	390.41 ± 17.8 ^{b^{bc}}
Jumbo 2010	40.04 ± 1.5 ^d	551.82 ± 29.3 ^d	36.17 ± 1.7 ^{abc}	435.69 ± 33.9 ^{abc}
Blanoro	21.59 ± 0.4 ^g	197.62 ± 8.3 ^g	32.94 ± 0.9 ^c	369.54 ± 18.4 ^c
Hoga 021	34.09 ± 0.6 ^e	437.50 ± 11.2 ^e	35.30 ± 1.6 ^{abc}	417.93 ± 33.1 ^{abc}
Hoga 340	47.42 ± 1.5 ^c	693.22 ± 29.6 ^c	37.36 ± 1.1 ^{ab}	460.10 ± 22.2 ^{ab}
ICC3421	29.49 ± 0.2 ^f	349.22 ± 4.5 ^f	37.39 ± 1.2 ^{ab}	460.54 ± 24.0 ^{ab}
Promedio	41.52^A	580.22^A	36.14^A	435.02^A
DESI				
ICC6306	43.40 ± 2.7 ^{cd}	616.16 ± 51.7 ^{cd}	36.59 ± 0.9 ^b	444.12 ± 18.01 ^b
ICC3761	41.47 ± 0.2 ^{de}	579.10 ± 2.2 ^{de}	40.28 ± 0.5 ^a	518.69 ± 10.6 ^a
ICC4418	35.24 ± 1.8 ^f	459.57 ± 35.3 ^f	35.02 ± 0.8 ^b	412.16 ± 15.9 ^b
ICC3512	52.95 ± 0.8 ^a	799.41 ± 14.9 ^a	36.76 ± 0.8 ^b	447.67 ± 16.4 ^b
ICC5383	49.50 ± 0.1 ^{ab}	733.19 ± 1.4 ^{ab}	35.68 ± 1.8 ^b	425.48 ± 37.7 ^b
ICC13124	38.47 ± 1.4 ^{ef}	521.63 ± 28.1 ^{ef}	34.20 ± 1.3 ^b	395.29 ± 26.9 ^b
ICC14872	42.41 ± 1.0 ^d	597.22 ± 19.5 ^d	36.13 ± 1.7 ^b	434.80 ± 36.6 ^b
ICC5613	47.22 ± 0.9 ^{bc}	689.46 ± 17.7 ^{bc}	35.96 ± 1.1 ^b	431.25 ± 22.6 ^b
Promedio	43.83^A	624.47^A	36.32^A	438.68^A

Los resultados están expresados en base seca y corresponden a la actividad antioxidante del hidrolizado a una concentración de 1 mg de proteína soluble/mL de hidrolizado. Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio de cada tipo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con una prueba t.

Cuadro 25. Actividad antioxidante *in vitro* por DPPH de las fracciones de albúminas y globulinas de los genotipos de garbanzo estudiados

Genotipo	Albúminas		Globulinas	
	% Inhibición	μmol ET/ L	% Inhibición	μmol ET/ L
KABULI				
Surutato 77	45.11 ± 1.5 ^{cde}	30.35 ± 1.4 ^{cde}	23.07 ± 2.2 ^b	8.76 ± 2.2 ^b
Sto. Dom. 82	54.40 ± 3.2 ^b	39.45 ± 3.1 ^b	28.78 ± 0.7 ^a	14.35 ± 0.6 ^a
Bco. Sin. 92	50.53 ± 3.3 ^{bc}	35.66 ± 3.2 ^{bc}	25.68 ± 1.5 ^{ab}	11.32 ± 1.5 ^{ab}
Progreso 95	56.46 ± 0.7 ^b	41.47 ± 0.7 ^b	28.85 ± 1.0 ^a	14.43 ± 1.0 ^a
Suprema 03	64.46 ± 1.0 ^a	49.30 ± 1.0 ^a	24.78 ± 2.0 ^{ab}	10.43 ± 1.2 ^{ab}
Jumbo 2010	41.75 ± 0.5 ^{de}	27.06 ± 1.1 ^{de}	23.53 ± 0.8 ^b	9.21 ± 0.8 ^b
Blanoro	39.96 ± 0.3 ^e	25.31 ± 0.4 ^e	23.16 ± 1.3 ^b	8.85 ± 1.3 ^b
Hoga 021	43.35 ± 2.8 ^{de}	28.63 ± 2.7 ^{de}	25.83 ± 0.5 ^{ab}	11.47 ± 0.5 ^{ab}
Hoga 340	46.95 ± 3.5 ^{cd}	32.15 ± 3.4 ^{cd}	25.04 ± 1.7 ^{ab}	10.69 ± 1.7 ^{ab}
ICC3421	22.99 ± 1.1 ^f	8.68 ± 1.0 ^f	26.29 ± 1.4 ^{ab}	11.92 ± 1.4 ^{ab}
Promedio	46.59^A	31.81^A	25.50^B	11.14^B
DESI				
ICC6306	45.37 ± 1.1 ^c	30.61 ± 1.5 ^c	26.50 ± 0.5 ^a	12.12 ± 0.4 ^a
ICC3761	40.15 ± 0.6 ^d	25.49 ± 1.0 ^d	26.98 ± 1.7 ^a	12.60 ± 1.6 ^a
ICC4418	40.26 ± 1.5 ^d	25.60 ± 1.4 ^d	24.76 ± 1.0 ^a	10.42 ± 1.0 ^a
ICC3512	54.41 ± 1.1 ^a	39.46 ± 1.1 ^a	27.39 ± 1.2 ^a	13.00 ± 0.6 ^a
ICC5383	49.40 ± 2.3 ^b	34.55 ± 2.3 ^b	27.19 ± 2.1 ^a	12.80 ± 2.0 ^a
ICC13124	52.44 ± 1.5 ^{ab}	37.53 ± 1.4 ^{ab}	27.62 ± 0.4 ^a	13.22 ± 1.0 ^a
ICC1487	45.31 ± 1.5 ^c	30.54 ± 1.0 ^c	27.04 ± 1.0 ^a	12.65 ± 1.6 ^a
ICC5613	53.29 ± 1.0 ^{ab}	38.36 ± 1.2 ^{ab}	26.40 ± 1.6 ^a	12.02 ± 1.2 ^a
Promedio	47.58^A	32.77^A	26.73^A	12.35^A

Los resultados están expresados en base seca y corresponden a la actividad antioxidante del hidrolizado a una concentración de 1 mg de proteína soluble/mL de hidrolizado. Letras diferentes en una misma columna para el mismo tipo de garbanzo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey. Letras diferentes para los valores promedio de cada tipo indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo con una prueba t.

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de la enzima alcalasa para producir péptidos con alta AA; sin embargo, se requiere de análisis más específicos para conocer cuáles son los péptidos que le confieren esta actividad a los hidrolizados, por lo que se decidió realizar el perfil de péptidos presentes en los hidrolizados. Para ello, primeramente se realizó un análisis de componentes principales para seleccionar el genotipo de garbanzo más sobresaliente y hacer la caracterización. El análisis de componentes principales (Fig. 21) mostró similitudes y diferencias entre los genotipos de garbanzo. Dos componentes explicaron más de la mitad de la variación total observada (55.9%) en el contenido de proteínas y la AA de los hidrolizados de garbanzo. El primer componente (PC1, 30.6%) se asoció con la AA y el segundo con el contenido de proteínas (PC2, 25.3%). Basado en este análisis, los mejores genotipos de garbanzo fueron ICC3761, ICC14872, Bco. Sin. 92 y Hoga 340, los cuales se localizaron en el cuadrante positivo de ambos componentes principales. De estos genotipos se decidió seleccionar a ICC3761 para la caracterización del perfil de péptidos y actividades biológicas.

2 Actividad antioxidante y antidiabética *in vitro* de fracciones proteínicas purificadas a partir del genotipo ICC3761

a Actividad antioxidante de las fracciones purificadas de globulinas y albúminas

La separación cromatográfica de los hidrolizados de albúminas y globulinas del genotipo ICC3761 muestra un gran número de picos cromatográficos (Fig. 22), los cuales estuvieron conformados por más de un péptido (Ver perfil de péptidos de cada fracción en los ANEXOS 1 y 2). La fracción globulinas consta de 170 péptidos y la de albúminas de 303, todos ellos con actividades biológicas predichas importantes, por lo que se decidió dividir el perfil de cada hidrolizado en tres fracciones, las cuales se recolectaron cada 30 min (FA1, FA2, FA3, FG1, FG2 y FG3). En el hidrolizado de albuminas, la FA1 estuvo conformada por 60 péptidos de alrededor de 433 Da, la FA2 de 92 péptidos de alrededor de 618 Da y FA3 de 151 péptidos con peso molecular promedio de 669 Da.

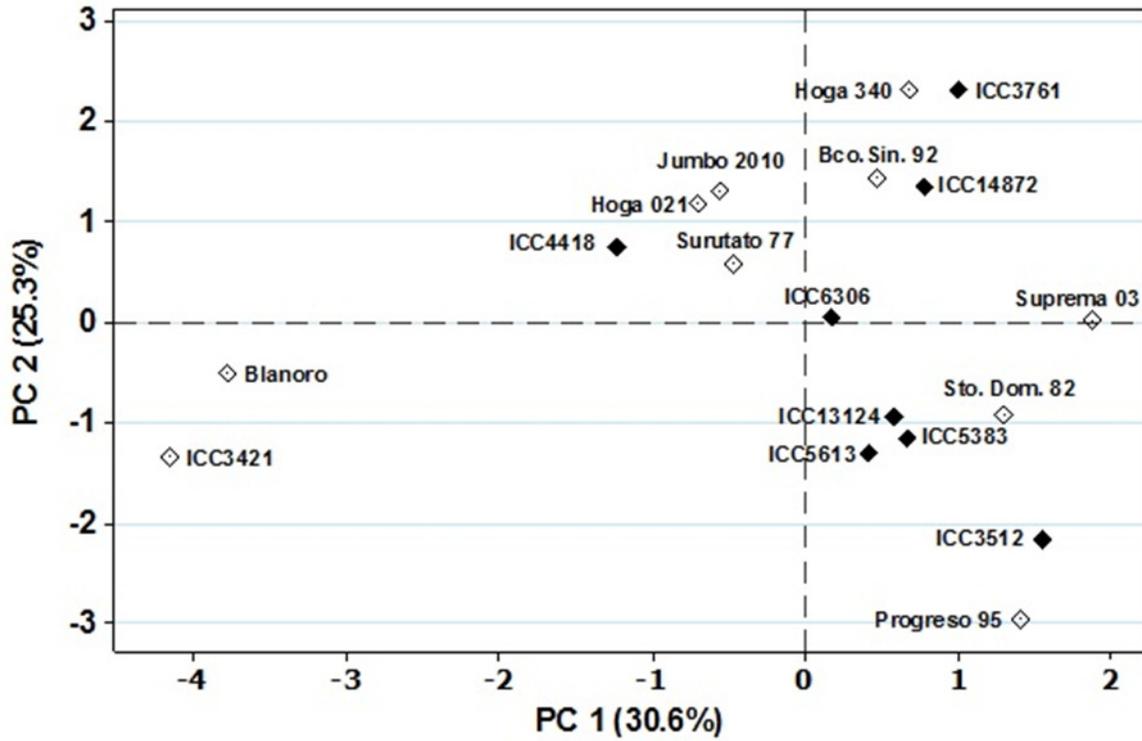


Fig 21. Análisis de componentes principales de 18 genotipos de garbanzo basado en el contenido de proteínas y la actividad antioxidante de los hidrolizados. Kabuli (rombos blancos) y desi (rombos negros).

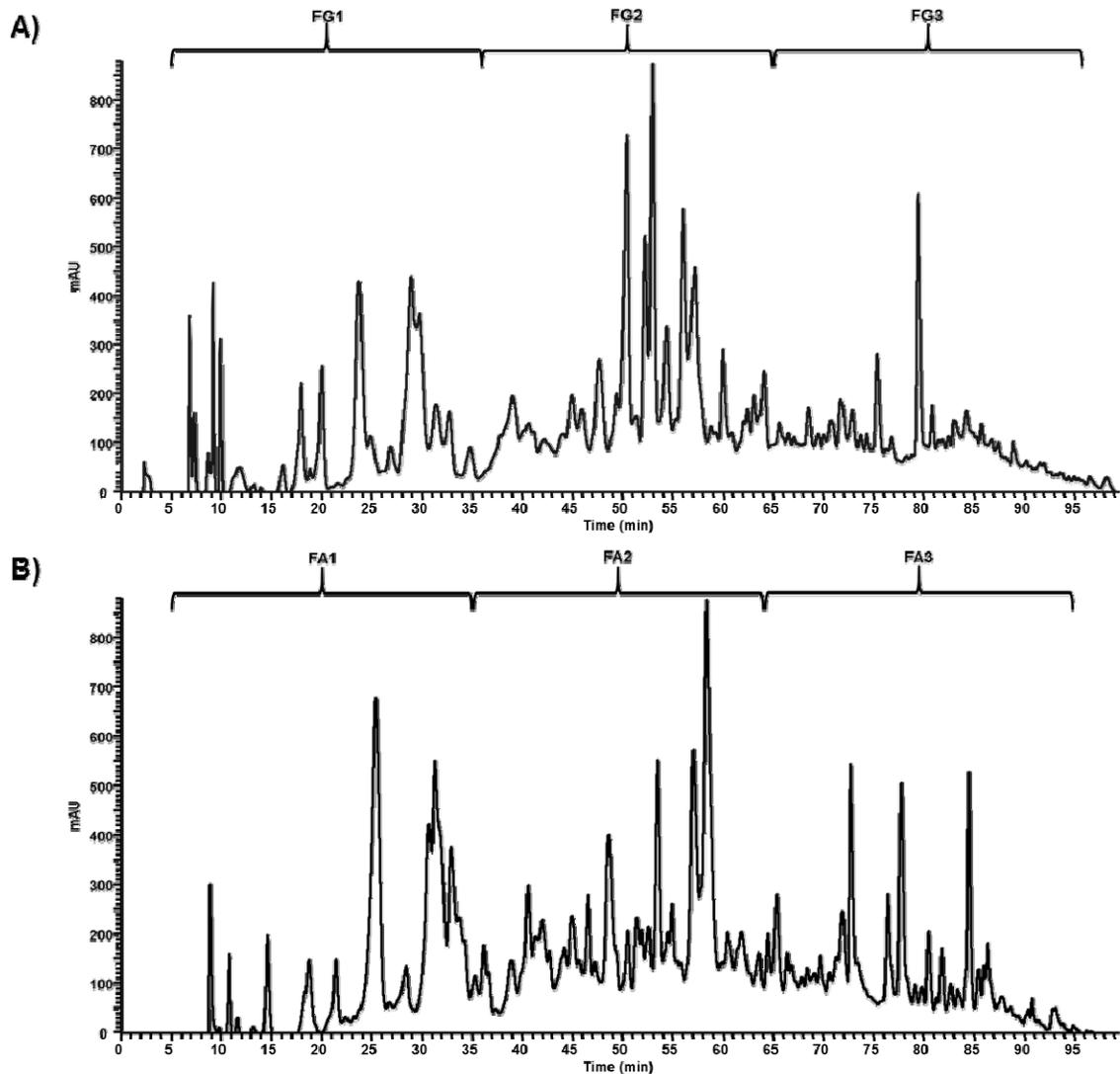


Fig 22. Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de hidrolizados proteínicos obtenidos con alcalasa de las fracciones de globulinas (A) y albúminas (B) del genotipo ICC3761.

FA1, Fracción de albúminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albúminas 2 (35-65 min); FA3, Fracción de albúminas 3 (65-95 min); FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (35-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (65-95 min).

En el hidrolizado de globulinas, la FG1 tuvo 26 péptidos con pesos moleculares de alrededor de 490 Da, la FG2 presentó 111 péptidos de entre 287 y 1692.31 Da, y la FG3 contenía 33 péptidos de alrededor de 475 Da. Estas fracciones fueron evaluadas en su AA y antidiabética (Cuadro 26).

La AA por ABTS y DPPH de los hidrolizados se evaluó a 0.2 mg/ mL, ya que concentraciones más elevadas inactivaban completamente los radicales.

Los valores de AA por ABTS de las seis fracciones estuvo en el rango de 61.53 a 767.07 $\mu\text{mol ET/L}$ (Cuadro 26). La AA para las albúminas (490.87-767.07 $\mu\text{mol ET/L}$) estuvo en el rango reportado por Kou y col (2013) para tres fracciones purificadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño a partir de la fracción de albúminas de garbanzo (550-967 $\mu\text{mol ET/L}$ para concentraciones de 0.5 mg/ mL).

En el ensayo DPPH se observaron porcentajes de inhibición de 26.87 a 48.87% (Cuadro 26). Con base en la concentración utilizada (0.2 mg/ mL), estos valores son superiores a los reportados por Kou y col (2013) para fracciones purificadas de albúminas e hidrolizadas secuencialmente con alcalasa y flavourzyme (40 - 74%, 0.5 mg/ mL), e inferiores a los reportados por Torres-Fuentes y col (2015) en tres fracciones de proteína de garbanzo hidrolizadas secuencialmente con pepsina y pancreatina (31 - 51%, 0.1 mg/ mL).

De las seis fracciones, la que mostró los mayores valores antioxidantes fue la fracción de albúminas FA1, en la cual se encuentran péptidos con mayor polaridad que en el resto, por lo que son más solubles en agua y tienen mayor capacidad de interactuar con los radicales utilizados en los ensayos antioxidantes, facilitando la transferencia de átomos de hidrógeno y en el caso de los grupos R de algunos aminoácidos la transferencia de electrones.

b Actividad antidiabética de las fracciones purificadas de globulinas y albúminas

La inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa retrasa y disminuye la liberación de glucosa libre, disminuyendo los niveles posprandiales de glucosa en sangre. En el Cuadro 26 se presentan los porcentajes de inhibición obtenidos para estas enzimas al evaluar las fracciones purificadas a 0.1 mg/mL.

Cuadro 26. Actividad antioxidante y antidiabética *in vitro* de las fracciones purificadas a partir de los hidrolizados de globulinas y albúminas del genotipo ICC3761.

Fracción	ABTS ¹	DPPH ¹	α -Amilasa ²	α -Glucosidasa ²
Globulinas				
FG1	20.01 \pm 1.13 ^c (272 \pm 37.8 ^c)	31.04 \pm 1.77 ^b (18.78 \pm 2.1 ^c)	7.89 \pm 0.54 ^b	21.34 \pm 1.50 ^c
FG2	13.15 \pm 1.02 ^e (61.53 \pm 8.2 ^e)	26.87 \pm 1.83 ^c (13.75 \pm 2.2 ^e)	15.22 \pm 1.58 ^a	23.04 \pm 2.08 ^c
FG3	16.09 \pm 0.86 ^d (140.83 \pm 28.8 ^d)	27.13 \pm 1.95 ^c (15.43 \pm 1.0 ^{cd})	14.09 \pm 0.67 ^a	34.73 \pm 1.17 ^b
Albuminas				
FA1	34.80 \pm 0.6 ^a (767.07 \pm 21.7 ^a)	48.87 \pm 0.2 ^a (40.22 \pm 1.3 ^a)	13.69 \pm 1.09 ^a	50.49 \pm 1.95 ^a
FA2	26.55 \pm 1.1 ^b (490.87 \pm 34.1 ^b)	45.39 \pm 0.4 ^a (36.04 \pm 1.4 ^b)	14.90 \pm 1.15 ^a	32.24 \pm 1.68 ^b
FA3	28.51 \pm 0.6 ^b (556.51 \pm 20.6 ^b)	48.00 \pm 0.4 ^a (39.18 \pm 0.5 ^{ab})	10.47 \pm 1.12 ^b	33.86 \pm 1.67 ^b

Los resultados están expresados en base seca. ¹Los valores se reportan en porcentaje de inhibición y en μ moles equivalentes de trolox/L (valores entre paréntesis) correspondientes a 0.2 mg de proteína soluble/mL. ²Los valores se reportan como porcentaje de inhibición de la enzima y corresponden a 0.1 mg de proteína soluble/mL. FG1, Fracción de globulinas 1; FG2, Fracción de globulinas 2; FG3, Fracción de globulinas 3; FA1, Fracción de albuminas 1; FA2, Fracción de albuminas 2; FA3, Fracción de albuminas 3. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

En el caso de α -amilasa, los valores de inhibición oscilaron entre 7.89 y 15.22%, siendo la fracción de globulinas FG2 la que presentó los valores más altos, lo cual pudiera deberse a la acumulación de péptidos de mayor tamaño en la fracción globulinas (ANEXO 1) causando aglomeración de carbohidratos y limitando su disponibilidad. Oseguera-Toledo y col (2015) registraron valores de inhibición de α -amilasa de 10% para fracciones >10 kDa de frijol negro hidrolizadas con alcalasa; este valor es similar a los observados en el presente estudio (Cuadro 26). En la inhibición de α -glucosidasa, los valores para las albúminas (32.24-50.49%) fueron mayores que para las globulinas (21.34-34.73%), destacando la FA1 (Cuadro 26). Valores inferiores a los obtenidos para los hidrolizados con alcalasa de frijol negro (55%) (Oseguera-Toledo y col 2015). La fracción de albúminas FA1 fue la que mostró mejor AA y antidiabética, por lo que fue seleccionada para su purificación y análisis de actividades.

3 Actividad antioxidante y antidiabética *in vitro* de fracciones purificadas a partir de la fracción de albúminas FA1 del genotipo ICC3761

a Actividad antioxidante de fracciones purificadas a partir de FA1

La separación mediante RP-UPLC de la fracción FA1 muestra seis picos cromatográficos principales (FA1-1, FA1-2, FA1-3, FA1-4, FA1-5 y FA1-6) (Fig. 23), los cuales fueron recolectados para evaluar su AA y antidiabética (Cuadro 27). Las AA por ABTS y DPPH de las seis fracciones fueron altas. Los valores de ABTS variaron de 1200.80 a 2433.20 $\mu\text{mol ET/L}$, siendo mayores para la fracción FA1-5; estos valores son superiores a los reportados por Kou y col (2013) para una fracción purificada de albúminas (686 $\mu\text{mol ET/L}$) evaluada a la misma concentración utilizada en el presente estudio. La AA por DPPH de las seis fracciones fue de alrededor del 70% de inhibición, siendo la fracción FA1-1 la que alcanzó el mayor porcentaje de inhibición (72.46 %). Estos valores son superiores a los reportados por Kou y col (2013) para una fracción de albúminas purificada por cromatografía de exclusión por tamaño (43.5 %) y se encuentran dentro del rango reportado por Torres-Fuentes y col (2015) para 12 subfracciones purificadas por cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño (5 a 80 %, 0.1 mg/ mL).

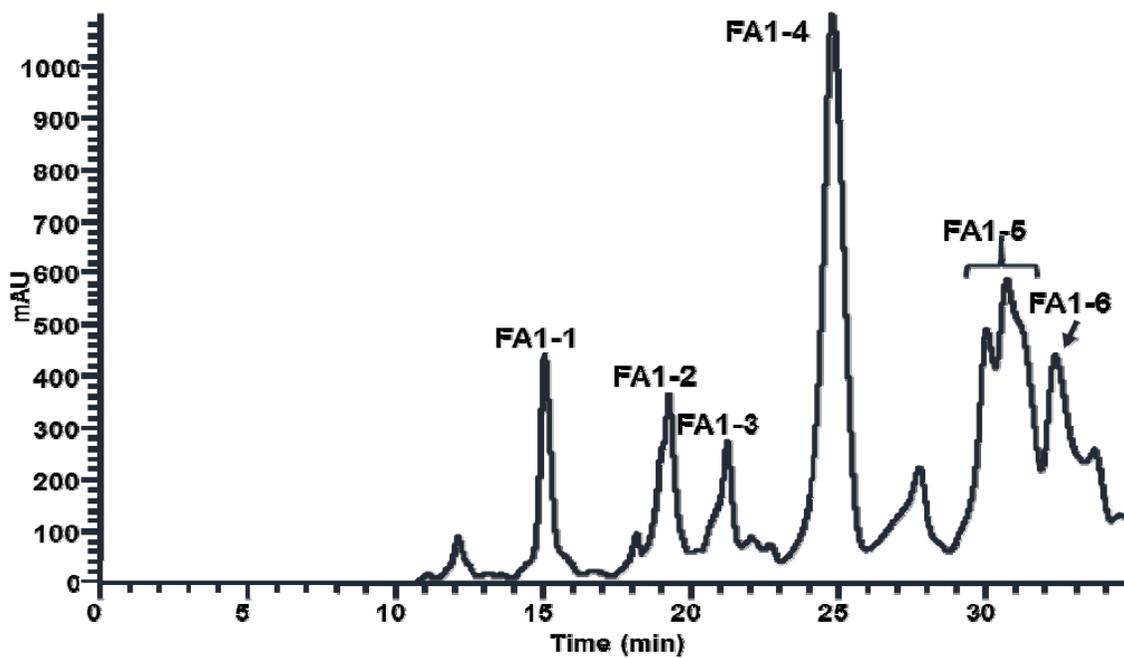


Fig 23. Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de la fracción de albúminas 1 (FA1) del genotipo ICC3761.

Cuadro 27. Actividad antioxidante y antidiabética *in vitro* de las fracciones purificadas a partir de la fracción de albuminas 1 (FA1) del genotipo ICC3761.

Fracción	ABTS ¹	DPPH ¹	α -Amilasa ²	α -Glucosidasa ²
FA1				
FA1-1	66.56 \pm 1.7 ^c (1981.59 \pm 63.3 ^c)	72.46 \pm 1.2 ^a (44.49 \pm 1.2 ^a)	43.99 \pm 1.1 ^c	47.38 \pm 4.1 ^b
FA1-2	71.23 \pm 1.6 ^b (2154.18 \pm 60.4 ^b)	69.99 \pm 0.8 ^{ab} (42.02 \pm 0.9 ^{ab})	37.30 \pm 1.0 ^d	45.57 \pm 1.7 ^b
FA1-3	73.10 \pm 1.7 ^b (2223.35 \pm 65.3 ^b)	71.81 \pm 1.2 ^{ab} (43.89 \pm 0.9 ^{ab})	57.73 \pm 3.1 ^b	60.53 \pm 0.4 ^a
FA1-4	45.45 \pm 2.0 ^e (1200.80 \pm 76.5 ^e)	69.34 \pm 0.9 ^b (41.36 \pm 1.0 ^b)	34.89 \pm 1.1 ^d	45.86 \pm 1.7 ^b
FA1-5	78.78 \pm 0.9 ^a (2433.2 \pm 36.3 ^a)	69.40 \pm 1.5 ^b (41.41 \pm 1.1 ^b)	66.62 \pm 1.5 ^a	57.02 \pm 1.5 ^a
FA1-6	61.60 \pm 1.7 ^b (1797.93 \pm 66.4 ^d)	69.97 \pm 0.6 ^{ab} (42.57 \pm 1.5 ^{ab})	63.25 \pm 1.1 ^a	49.41 \pm 1.9 ^b

Los resultados están expresados en base seca y se reportan como porcentaje de inhibición del radical o enzima. ¹Los valores se reportan en porcentaje de inhibición y en μ moles equivalentes de trolox/L (valores entre paréntesis) y corresponden a 0.2 mg de proteína soluble/mL. ²Los valores se reportan como porcentaje de inhibición de la enzima y corresponden a 0.1 mg de proteína soluble/mL. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Los resultados de AA demuestran que mientras menor sea el número de péptidos presentes en los hidrolizados, mayor es su capacidad antioxidante, lo cual podría deberse a la disminución de interacciones entre ellos, favoreciendo interacciones directas con los radicales utilizados en los estudios.

b Actividad antidiabética de fracciones purificadas a partir de FA1

La fracción FA1-5 mostró las mayores actividades inhibitorias: con la α -amilasa, el valor para FA1-5 (66.62%) fue similar a FA1-6 (63.25%) ($P < 0.05$); mientras que con la α -glucosidasa, FA1-3 (60.53%) y FA1-5 (57.02%) fueron similares ($P < 0.05$) (Cuadro 27). Los porcentajes de inhibición observados para estas dos enzimas son similares a los reportados por Oseguera-Toledo y col (2015) para péptidos menores a 1 kDa obtenidos de hidrolizados de frijol negro con alcalasa: 30-50% (α -amilasa) y 50-60% (α -glucosidasa).

Los altos porcentajes de inhibición enzimática y AA de FA1-5 sugieren su potencial antidiabético y se procedió a identificar los péptidos que la componen.

4 Perfil de péptidos, actividad antioxidante y antidiabética de la subfracción de albúminas FA1-5 del genotipo ICC3761

a Perfil de péptidos de la subfracción FA1-5

Como se mencionó en los apartados anteriores, la subfracción FA1-5 fue la que mostró los mejores porcentajes de inhibición del radical ABTS, enzima α -amilasa y α -glucosidasa, por lo que se separó mediante RP-UPLC-DAD-ESI-MS/MS con el objetivo de conocer y purificar los péptidos presentes en ella.

El análisis por RP-UPLC-DAD-ESI-MS/MS de la separación de FA1-5 mostró cuatro picos cromatográficos definidos (Fig 24) que fueron caracterizados por espectrometría de masas. Como ejemplo de la caracterización, la Figura 25 muestra el análisis para el pico 3 de la subfracción FA1-5: de la huella peptídica (MS) de FA1-5 (Fig. 25A) se seleccionó y analizó (MS/MS) el ión m/z 408.23 (Fig. 25B) para determinar que correspondía al péptido FGKG. Este análisis se realizó para los cuatro picos observados.

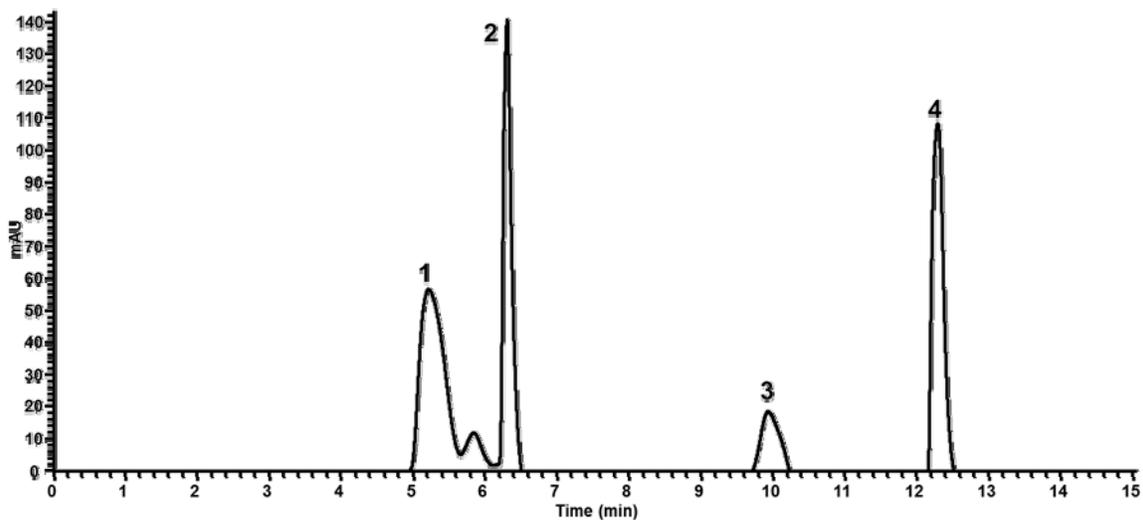


Fig 24. Separación cromatográfica (UPLC-DAD) de la subfracción de albúminas FA1-5 del genotipo ICC3761. Los péptidos identificados en cada pico por espectrometría de masas son: 1, FEI, FEL, FIE; 2, FKN; 3, FGKG; 4, MEE.

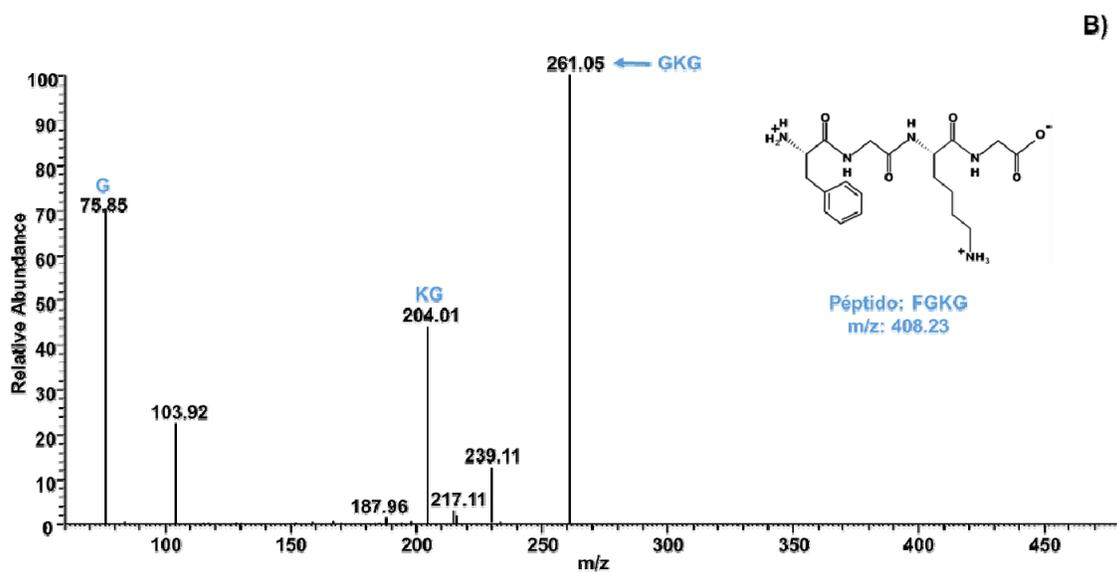
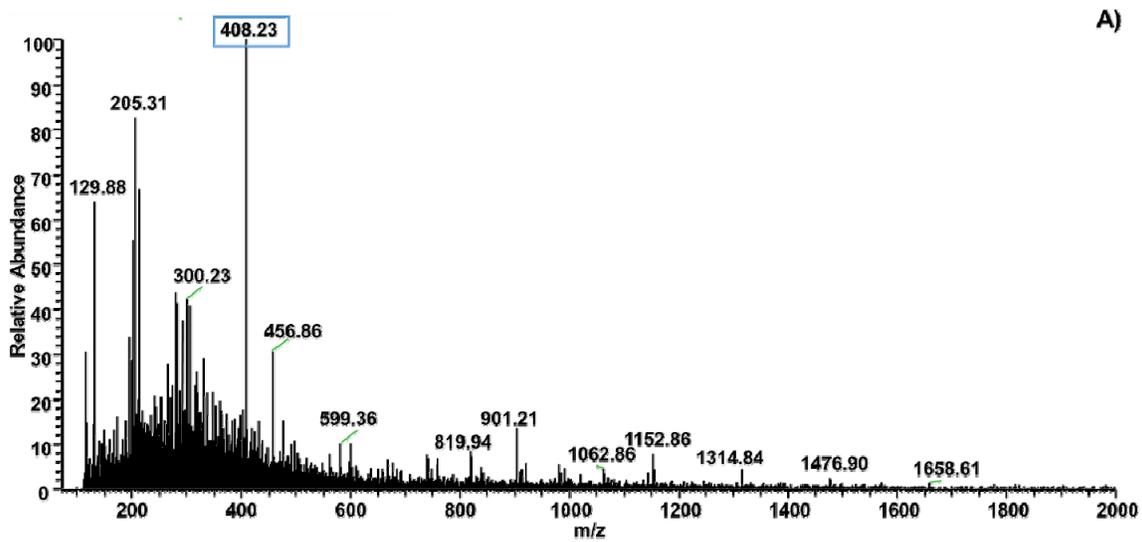


Fig 25. Identificación por espectrometría de masas del pico 3 indicado en la Figura 24. A) Huella peptídica de la fracción FA1-5. B) Espectro MS/MS del ión indicado con un recuadro en la Figura A.

Los pesos moleculares, características fisicoquímicas y posible actividad biológica de los péptidos identificados en la subfracción FA1-5 se muestran en el Cuadro 28, donde se puede observar que el orden de elución para los péptidos coincide con sus valores de hidrofobicidad.

Mediante el análisis de espectrometría de masas se pudo observar que el pico 1 estaba conformado por los tri-péptidos FEI, FEL y FIE, los cuales corresponden casi a los mismos aminoácidos, pero en diferente orden; estos tres péptidos poseen características químicas y estructurales muy similares (Cuadro 28; Fig. 26), lo que hace difícil su purificación individual. El péptido FEL (LEF) forma parte del péptido de frijol pinto VVNEGEAHVELVGPKET**LEF**ESY obtenido por Garcia-Mora y col (2016) mediante hidrólisis con la enzima savinasa. También se han reportado fragmentos de los péptidos FEI y FIE en frijol pinto, frijol negro y garbanzo (Oseguera-Toledo y col, 2015; Torres-Fuentes y col, 2015; Garcia-Mora y col, 2016; Oseguera Toledo y col, 2016; García-Mora y col, 2017).

El pico 2 corresponde al péptido FKN reportado por Garcia-Mora y col (2015) como parte de los péptidos SQDNPFYFNSDNSWNTL**FKN**, DNSWNTL**FKN**QYGHFRVL Y SDNSWTL**FKN**QYGHIRVL obtenidos por hidrólisis con alcalasa de proteínas de frijol pinto.

En cuanto al pico 3 identificado como FGKG, el péptido no ha sido registrado en la literatura pero sí fragmentos: KG (GK) se reportó como parte de los péptidos DKGGLL (frijol pinto Durango), YAL**KG** (garbanzo), SAKFPPAG**GK**, **NKG**APPAAG**K** y **KG**AGGRGH (frijol negro) reportados en leguminosas por diversos autores (de Souza Rocha y col, 2015; Oseguera-Toledo y col, 2015; Torres-Fuentes y col, 2015). El fragmento FGK forma parte los péptidos SRNPIYSNK**FGK** y SPIYSNK**FGK** reportados en hidrolizados de proteína de garbanzo germinado obtenidos mediante hidrolisis secuencial con pepsina y pancreatina (Milan-Noris y col, 2018).

El ultimo pico cromatográfico corresponde al péptido MEE, el cual forma parte de los péptidos SIEM**EE**GALFVPHYYSKAIVIL y SIEM**EE**GGALFVPH reportados por Garcia-Mora y col (2015) en hidrolizados de frijol pinto con alcalasa, así como en el péptido ISSIEM**EE**GALFPH reportado por Garcia-Mora y col (2016) en hidrolizados de frijol pinto con savinasa.

Cuadro 28. Perfil de péptidos de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761

Fracción	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	pI	Hidrofobicidad (Kcal/ mol)	Carga neta	Posible Actividad	Proteína Parental
FA1-5								
Pico 1	408.19	407.19	FEI	3.20	8.30	- 1	Antihipertensiva, Antidiabética	Fenilalanina amonioliase II Proteína ribosomal 40S
	408.22	407.22	FEL	3.20	8.57	- 1	Antioxidante	HSP70
	408.19	407.19	FIE	3.09	8.70	- 1	Antihipertensiva	Lipoxigenasa/ NADPH- Quinona Oxidorreductasa
Pico 2	408.22	407.22	FKN	9.93	9.84	+ 1		Proteína de 25.7 kDa
Pico 3	479.24	478.24	FGKG	9.93	11.29	+ 1	Antihipertensiva, Antidiabética	ATP sintasa subunidad B
Pico 4	408.16	407.16	MEE	2.92	14.49	- 2	Antihipertensiva, Antidiabética	Proteína D2

pI: Punto isoelectrico. El punto isoelectrico, la hidrofobicidad y la carga neta de los péptidos se obtuvieron en PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>). Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento del mismo. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra.

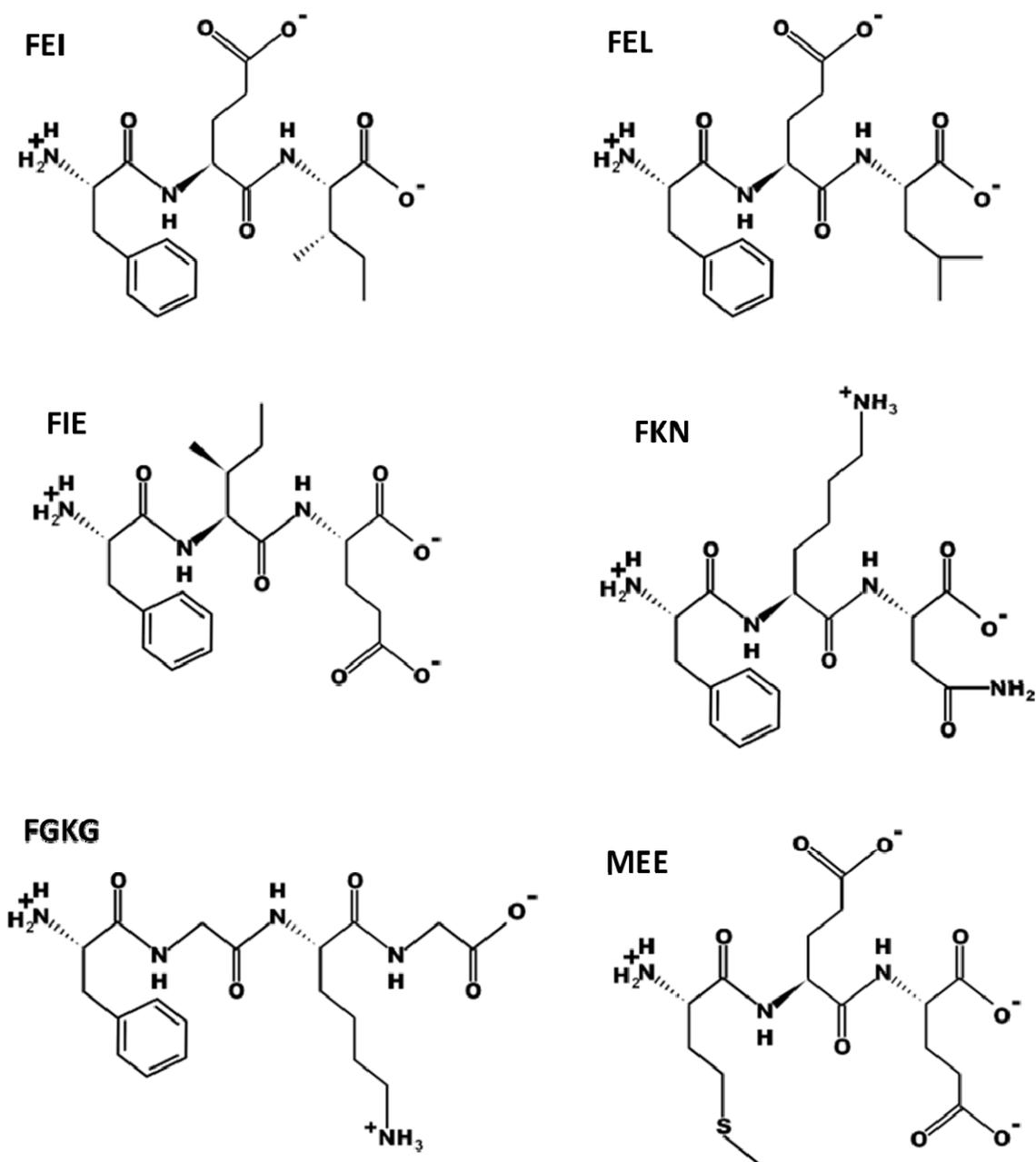


Fig 26. Estructura de los péptidos identificados en la subfracción FA1-5 del genotipo ICC3761. La estructura de los péptidos se obtuvo en PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>). Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra.

De acuerdo al análisis *in silico* en la plataforma BIOPEP, los péptidos identificados en la fracción FA1-5 podrían tener la capacidad de inactivar especies reactivas de oxígeno, inhibir enzimas antidiabéticas y antihipertensivas, por lo que se evaluaron algunas de estas actividades en los péptidos purificados.

b Actividad antioxidante de los péptidos purificados

La actividad de los péptidos depende no solo del peso molecular, sino también de su estructura química, es decir de la composición aminoacídica, del tipo de aminoácido en N y C terminal, las características hidrofóbicas/hidrofílicas de las cadenas laterales, entre otros (Sánchez y Vázquez, 2017; Zhang y col, 2019). En el Cuadro 29 se muestra la AA por ABTS y DPPH de los péptidos purificados a partir de la subfracción FA5-1.

1) ABTS

Los valores de ABTS para los péptidos (0.2 mg/ mL) variaron entre 37.39 y 78.25 % (Cuadro 29), los cuales son superiores a los reportados por Zhang y col (2019) para 4 péptidos sintetizados a partir de secuencias encontradas en hidrolizados de soya (54.1 a 70.8 %; evaluados a 1 mg/ mL). Los resultados demuestran que la carga de los péptidos tiene mucho peso en la AA, ya que los péptidos cargados negativamente presentaron los mayores valores (FEI, FEL y FIE, 74.14%; MEE, 48.02 %). Otro parámetro de importancia es la presencia de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, ya que se sabe que el anillo bencénico de su cadena lateral tiene la capacidad de actuar como estabilizador de radicales libres mediante la donación de electrones (Sánchez y Vázquez, 2017). También se ha reportado que la presencia de leucina en el extremo C terminal aumenta la AA; por ejemplo Chen y col (1996) observaron que al cambiar el orden de los aminoácidos de los péptidos HPLH a HPHL y HHLP a HHPL, la actividad aumentada considerablemente. Lo anterior puede explicar el hecho de que los péptidos con mayor AA por el ensayo ABTS fueron aquellos que además de tener carga negativa tienen residuos de fenilalanina y leucina.

Cuadro 29. Actividad antioxidante *in vitro* de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761.

Péptido	ABTS (% Inhibición)	DPPH (% Inhibición)
FEI, FEL, FIE	78.25 ± 3.7 ^a	64.63 ± 5.7 ^b
FKN	40.09 ± 2.4 ^c	63.78 ± 0.4 ^b
FGKG	37.39 ± 2.5 ^c	73.65 ± 1.0 ^a
MEE	48.02 ± 1.6 ^b	74.14 ± 2.9 ^a

Los resultados están expresados en base seca. Valores correspondientes a 0.2 mg de proteína soluble/mL. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

2) DPPH

Diversos estudios han reportado que péptidos con mayor número de aminoácidos antioxidantes presentan mejor capacidad de inhibición del radical DPPH. Wang y col (2015a) evaluaron la AA de 9 péptidos de hidrolizados de carne de pato y observaron que péptidos con más del 50% de aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia presentaron valores de inhibición de DPPH altos (54 a 93 %); mientras que péptidos con 29% de aminoácidos hidrofóbicos presentaron valores bajos (16%). Esto coincide con lo observado en el presente estudio, donde el péptido con mayor hidrofobicidad fue el que presentó la mayor AA por DPPH (MEE, 74.14 %) y los péptidos menos hidrofóbicos son los que presentaron los menores valores (FEI, FEL, FIE; 64.63 %; FKN, 63.78 %) (Cuadro 29). Estos valores son superiores a los observados por Zhang y col (2019) en cuatro péptidos de soya (40-47%; concentración de 1 mg/mL), lo cual podría deberse a que los péptidos sintetizados por estos autores presentan valores de hidrofobicidad menores que los de los péptidos obtenidos en el presente estudio.

c Actividad antidiabética de los péptidos purificados

Una alternativa para disminuir la glucosa postprandial y controlar la diabetes es el uso de medicamentos no farmacológicos como los péptidos bioactivos. Las leguminosas son una buena fuente de proteínas y péptidos bioactivos. Debido a que la actividad antidiabética fue una de las predichas para los péptidos purificados (Cuadro 28), se evaluó su capacidad de inhibir enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos como α -amilasa y α -glucosidasa, así como la enzima Dipeptidil peptidasa-4 involucrada en la diabetes tipo 2.

1) α -amilasa

La inhibición de α -amilasa de los péptidos purificados (39.96-54.12%) fue superior para FGKG (54.12%) (Cuadro 30). Estos valores son similares a los reportados por Oseguera-Toledo y col (2015) para hidrolizados proteínicos (> 1 kDa) de frijol pinto Durango y frijol negro 8025 (30-50 %).

La α -amilasa está formada por tres dominios (A, B y C); la triada catalítica de esta enzima se encuentra en el dominio A (ASP¹⁹⁷, GLU²³³ y ASP³⁰⁰) (Brayer y col, 1995). Por lo tanto, la obtención de péptidos que interactúen con estos aminoácidos ayuda a disminuir la actividad de esta enzima. El efecto es más notorio cuando el efecto es sobre ASP¹⁹⁷: la actividad específica de la enzima se reduce hasta 10⁶ veces al sustituir/cambiar/bloquear este aminoácido. En cambio, la sustitución de los aminoácidos GLU²³³ y ASP³⁰⁰ disminuye su eficiencia 10³ veces (Brayer y col, 2000).

El análisis de acoplamiento molecular (Fig. 27) indicó que todos los péptidos interactuaron con el principal aminoácido catalítico ASP¹⁹⁷, con excepción de MEE, el cual no mostró interacciones con ninguno de los 3 aminoácidos de la triada catalítica; sin embargo, si interactuó con otros aminoácidos que forman parte del sitio activo de la enzima como ARG¹⁹⁵, TRP⁵⁹, HIS¹⁰¹ e HIS³⁰⁵ (ANEXO 3).

Los péptidos FGKG y FKN interactuaron con los 3 aminoácidos catalíticos de la enzima α -amilasa (ASP¹⁹⁷, GLU²³³ y ASP³⁰⁰) (Fig. 27), lo que sugiere que actúan mediante una inhibición competitiva, sin embargo se requieren más estudios para demostrarlo. Las diferencias en los porcentajes de inhibición entre ambos péptidos podrían deberse a las interacciones entre estos y el resto de los aminoácidos de la enzima, así como a la estabilidad de la interacción. FGKG presentó interacciones con los residuos TRP⁵⁹, LEU¹⁶², ALA¹⁹⁸ e HIS³⁰⁵; mientras que FKN interactuó con TRP⁵⁸, TRP⁵⁹ y HIS³⁰⁵. Estos aminoácidos también presentan interacciones con acarbosa e inhibidores proteicos de frijol (Nahoum y col, 2000). Las interacciones hidrofóbicas entre LEU¹⁶²-PHE¹ y ALA¹⁹⁸-PHE¹ del péptido FGKG parecen tener un gran peso en la estabilización del inhibidor, dado que FGKG fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibición y la menor energía de enlace (-10.047 kcal/mol) (Cuadro 31); mientras más negativo es el valor de energía de enlace, más estable es la interacción (London y col, 2011).

Cuadro 30. Porcentaje de inhibición de α -amilasa de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761.

Péptido	α-Amilasa (% Inhibición)
FEI, FEL, FIE	39.96 \pm 0.3 ^d
FKN	46.84 \pm 1.0 ^b
FGKG	54.12 \pm 0.5 ^a
MEE	43.44 \pm 0.7 ^c

Los resultados están expresados en base seca. Valores correspondientes a 0.1 mg de proteína/mL. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

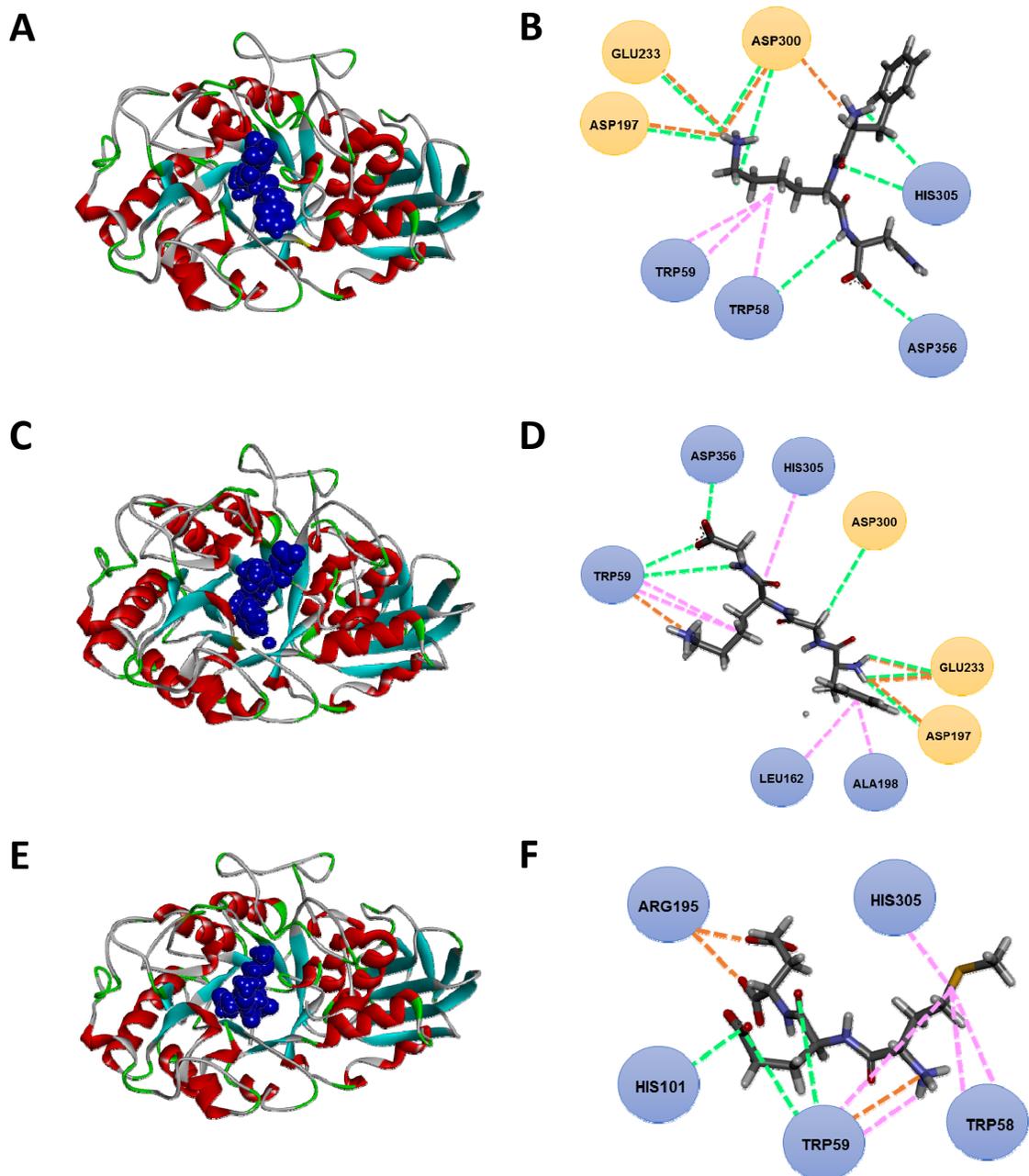


Fig 27. Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -amilasa: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F). Interacciones electrostáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas).

Cuadro 31. Energía total, energía de interacción y número de interacciones totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima α -amilasa.

Péptido	Energía Total (kcal/ mol)	Energía de Unión (kcal/ mol)	Interacciones Totales	Puentes de Hidrógeno
FEI	-908.831	-7.320	7	2
FEL	-904.630	-5.300	10	2
FIE	-909.871	-6.620	8	1
FKN	-904.431	-9.370	12	8
FGKG	-907.140	-10.04	13	7
MEE	-900.880	-7.839	11	4

Los resultados del acoplamiento molecular de los péptidos FEI, FEL y FIE se muestran en la Figura 28. El péptido FEI mostró interacciones electroestáticas con ASP^{197} , LYS^{200} , GLU^{233} ; hidrofóbicas con TRP^{58} , TRP^{59} y TYR^{62} ; y puente de hidrógeno con ASP^{197} . Se observaron 10 interacciones totales entre α -amilasa y el péptido FEL, de las cuales 6 fueron electroestáticas (ASP^{194} , GLU^{233} , ASP^{300} , TYR^{62} y TRP^{59}), 2 hidrofóbicas (LEU^{162} y ILE^{235}) y 2 por puentes de hidrógeno (THR^{163} y HIS^{305}). El péptido FIE mostró 5 interacciones electroestáticas con GLU^{233} , LYS^{200} , ASP^{197} , ASP^{300} y TYR^{151} ; 3 hidrofóbicas con LEU^{162} , LYS^{200} y LEU^{162} ; y 1 puente de hidrógeno con GLU^{233} . De todos los péptidos evaluados, este grupo fue el que presentó los mayores valores de energía de enlace (-7.32, -5.30 y -6.62 kcal/ mol, respectivamente) (Cuadro 31), lo que coincide con el hecho de que estos péptidos presentaron los menores porcentajes de inhibición.

2) α -glucosidasa

Los porcentajes de inhibición para la enzima α -glucosidasa de los péptidos analizados se muestran en el Cuadro 32 (41.97-56.01%); del mismo modo que en la enzima α -amilasa, el péptido que presentó los mayores valores fue FGKG (56.01 %). Estos valores son inferiores a los reportados por Oseguera-Toledo y col (2015) para frijol pinto Durango (75 %) y frijol negro 8025 (70 %) para péptidos >1 kDa obtenidos mediante hidrólisis con alcalasa y bromelaína.

Los principales aminoácidos en el sitio activo de la α -glucosidasa son residuos ácidos (ASP^{518} , GLU^{521} y ASP^{616}) y básicos (ARG^{600} e HIS^{674}). El ASP^{518} actúa como nucleófilo, mientras que GLU^{521} y ASP^{616} actúan como catalizadores ácido/base estabilizando el estado de transición del sustrato en conjunto con ARG^{600} e HIS^{674} (Hermans y col, 1991; Roig-Zamboni y col, 2017; Ur Rehman y col, 2019).

De los péptidos analizados, solo FGKG mostró interacciones con aminoácidos del sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa. Este péptido interactuó mediante puente de hidrógeno no convencional entre el aminoácido catalítico ASP^{518} y GLY^4 (O—H), y el aminoácido del sitio activo ARG^{600} y LYS^3 (O—H) (Figura 29; ANEXO 4). La ARG^{600} es esencial en la actividad de la α -glucosidasa ya que su modificación o sustitución conduce a la pérdida de la actividad enzimática (Ur Rehman y col, 2019).

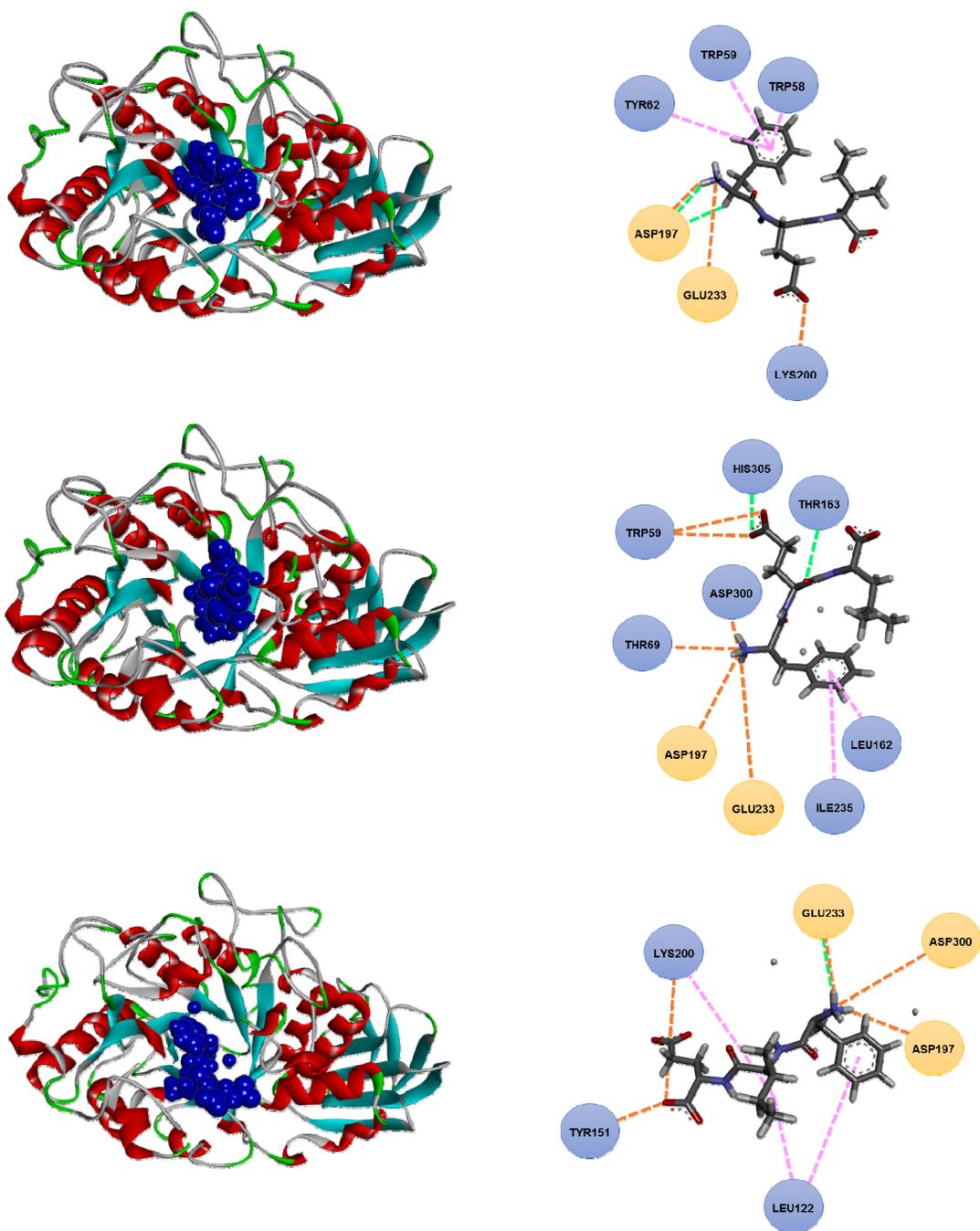


Fig 28. Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -Amilasa: FEI (A y B), FEL (C y D) y FIE (E y F). Interacciones electrostáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas).

Cuadro 32. Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761.

Péptido	α-Glucosidasa (% Inhibición)
FEI, FEL, FIE	53.56 \pm 0.7 ^b
FKN	43.29 \pm 0.4 ^c
FGKG	56.01 \pm 0.5 ^a
MEE	41.97 \pm 1.5 ^c

Los resultados están expresados en base seca. Valores correspondientes a 0.1 mg de proteína/mL. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

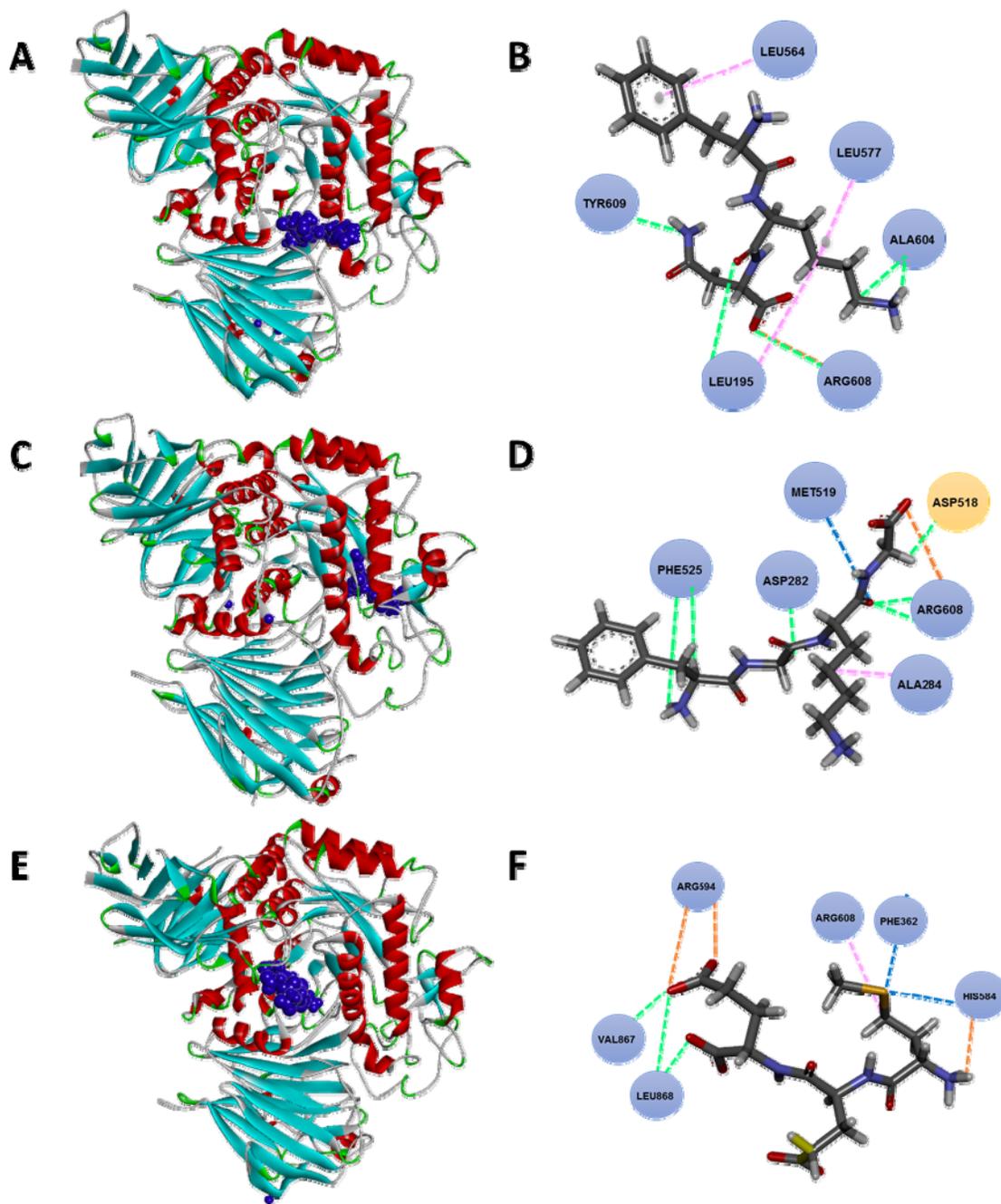


Fig 29. Acoplamiento molecular de diferentes péptidos con α -glucosidasa: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F). Interacciones electrostáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas) interacciones Sulfuro-X (líneas discontinuas azules).

El acoplamiento de α -glucosidasa con FKN mostró interacciones principalmente con aminoácidos hidrofóbicos del sitio activo; puentes de hidrógeno con ALA⁶⁰⁴, TYR⁶⁰⁹ y LEU¹⁹⁵; y formó interacciones hidrofóbicas con LEU¹⁹⁵, LEU⁵⁷⁷ y LEU⁵⁶⁵ (Fig. 29; ANEXO 4).

El péptido MEE formó enlaces pi-Sulfuro con PHE³⁶² e HIS⁵⁸⁴, interacciones hidrofóbicas con ARG⁶⁰⁸, puentes de hidrógeno con VAL⁸⁶⁷ y LEU⁸⁶⁸, e interacciones electroestáticas con ARG⁵⁹⁴ e HIS⁵⁸⁴. Este péptido fue el que presentó la mayor energía de enlace (Cuadro 33) y por lo tanto la interacción es menos estable que las del resto de péptidos; aun así es más fuerte que la interacción entre el inhibidor comercial acarbosa y α -glucosidasa reportada por Aispuro-Pérez y col (2019) (-4.42 Kcal/ mol).

De los seis péptidos, los del grupo correspondiente al pico 1 fueron los que presentaron menos interacciones con α -glucosidasa, aun así la energía de enlace entre proteína-ligando fue más fuerte que la de FKN y MEE (Cuadro 33). En el caso del péptido FEI, PHE¹ formó puente de hidrógeno con MET³⁶³ (pi-H) e interacciones hidrofóbicas tipo pi-alquil con TYR³⁶⁰ (Fig 30; ANEXO 4). El residuo PHE¹ de FEL y FIE también formó interacciones pi-alquil con ARG⁵⁹⁴ y ARG⁶⁰⁸, respectivamente.

Las interacciones observadas entre estos péptidos y α -glucosidasa sugieren inhibición no competitiva, debido a que ninguno de los aminoácidos con los que el péptido interactuó pertenecen al sitio activo; sin embargo se requieren más estudios para corroborarlo.

3) Dipeptidil peptidasa IV

La enzima DPP4 tiene dos sitios de unión: el sitio 1 (S1) está formado por aminoácidos hidrofóbicos (TYR⁵⁴⁷, TYR⁶³¹, VAL⁶⁵⁶, TRP⁶⁵⁹, TYR⁶⁶², TYR⁶⁶⁶ y VAL⁷¹¹) que permiten que los aminoácidos no cargados interactúen con la triada catalítica (SER⁶³⁰, ASP⁷⁰⁸/ASN⁷¹⁰ y HIS⁷⁴⁰); y el sitio 2 (S2) involucra interacciones claves con GLU²⁰⁵, GLU²⁰⁶ y ARG¹²⁵, y está formado por una cadena hidrofóbica larga y una cadena aromática que facilitan la unión de moléculas de alta afinidad; además tiene una cavidad más grande rodeada por VAL²⁰⁷, SER²⁰⁹, ARG³⁵⁸ y PHE³⁵⁷ que hacen un subsitio (S2') (De y col, 2019).

Cuadro 33. Energía total, energía de interacción y número de interacciones totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima α -glucosidasa.

Péptido	Energía Total (kcal/ mol)	Energía de Unión (kcal/ mol)	Interacciones Totales	Puentes de Hidrógeno
FEI	-1547.594	-7.178	3	1
FEL	-1531.947	-6.480	4	1
FIE	-1550.091	-7.009	4	1
FKN	-1529.735	-6.329	8	5
FGKG	-1545.985	-7.060	8	5
MEE	-1543.576	-6.320	9	3

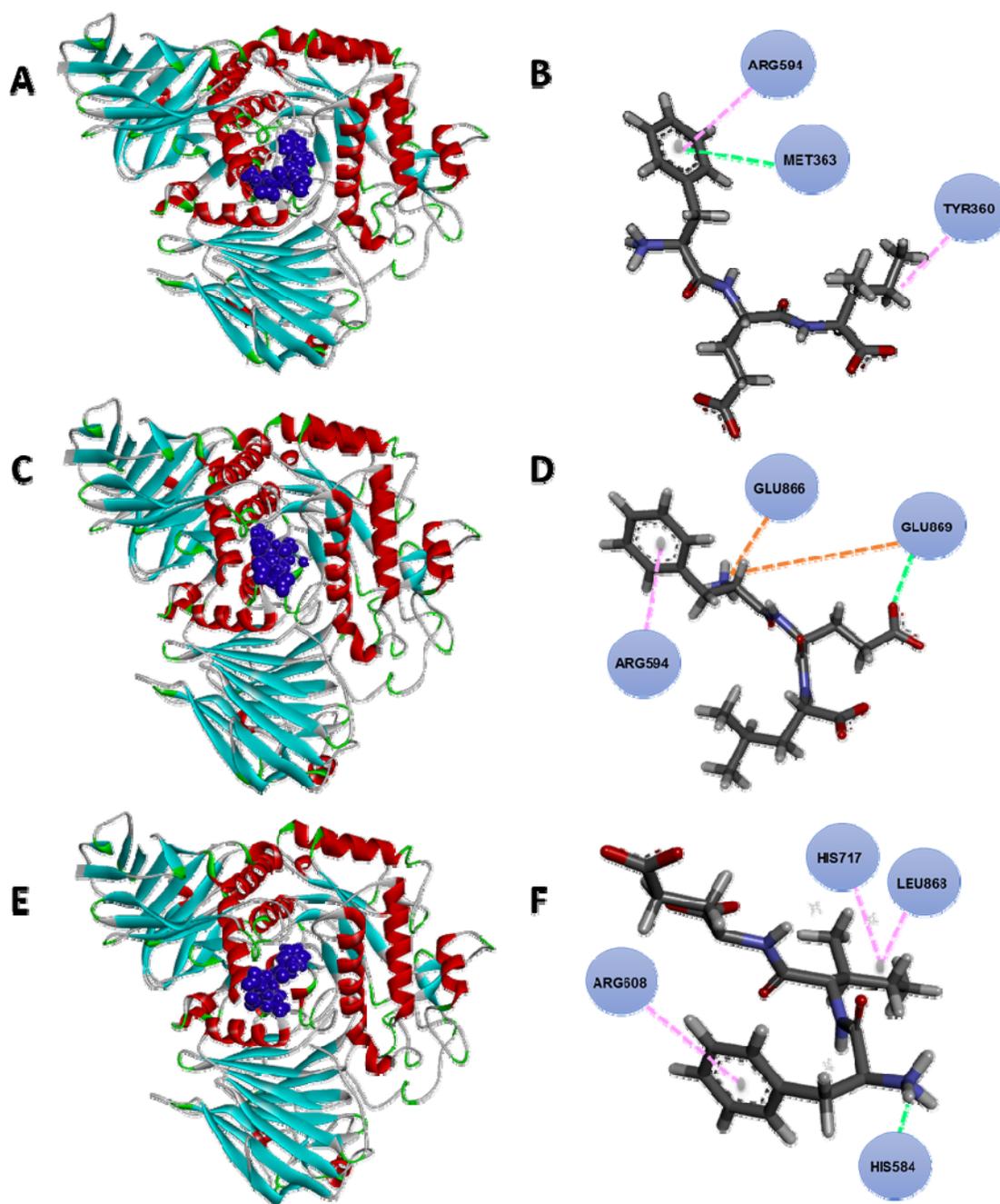


Fig 30. Acoplamiento molecular de distintos péptidos con α -glucosidasa: FEI (A y B), FEL (C y D), FIE (E y F). Interacciones electroestáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas).

La capacidad de los péptidos purificados de inhibir a la enzima DPP4 se muestra en el Cuadro 34. Los péptidos presentaron valores de inhibición relativamente buenos, comparables con inhibidores comerciales como Diprotina A (ILE-PRO-ILE; IC_{50} = 1.1 μ g/mL) y Diprotina B (VAL-PRO-ILE; IC_{50} = 5.5 μ g/mL) (Umezawa y col, 1984). Los péptidos del pico 1 (FEI, FEL y FIE) fueron los mejores inhibidores de esta enzima con valores de IC_{50} de 4.20 μ g/mL; cabe aclarar que mientras más pequeño sea el valor de IC_{50} , el péptido será mejor inhibidor de la enzima.

El análisis de acoplamiento molecular sugiere inhibición competitiva de la DPP4 por parte de todos los péptidos, con excepción de FKN que no interactúa con ningún aminoácido del sitio activo. La energía de unión de las interacciones fue en el siguiente orden: FIE (-13.054 kcal/mol), FEL (-12.698 kcal/mol), FGKG (-11.684 kcal/mol), MEE (-11.301 kcal/mol), FEI (-8.307 kcal/mol) y FKN (-8.190 kcal/mol) (Cuadro 35), lo que corresponde con lo observado en los porcentajes de inhibición donde los mayores valores los mostraron los péptidos con la energía de unión más baja, con excepción del péptido FEI.

El péptido FEI mostró interacciones hidrofóbicas tipo pi-alquilo con el aminoácido catalítico HIS⁷⁴⁰ y con TRP⁶²⁹ y VAL⁶⁵³; y tipo apilamiento pi-pi con TRP⁶²⁹. El aminoácido PHE¹ del péptido formó puentes de hidrógeno con TYR⁷⁵² y se observó una interacción electrostática entre GLU² y ARG⁵⁶⁰ (Figura 31; ANEXO 5). El péptido FEL interactuó con ARG¹²⁵ y GLU²⁰⁵, aminoácidos del S2 de la enzima. Entre el oxígeno el grupo carboxilo de GLU² y el grupo guanidino de ARG¹²⁵ se formaron puentes salinos. Este enlace también se observó entre GLU³ del péptido FIE y ARG¹²⁵ de la enzima. ARG¹²⁵ es responsable de fijar al inhibidor en el sitio activo (Hiramatsu y col, 2004).

FKN formó 6 interacciones con DPP4, 4 por puente de hidrógeno y 2 hidrofóbicas del tipo pi-alquilo. Los puentes de hidrógeno fueron con los aminoácidos ARG⁴⁵³, PRO⁵¹⁰ y dos con GLU⁴⁵². Las interacciones hidrofóbicas fueron con LYS⁵¹² e ILE⁵²⁹ (Figura 32; ANEXO 5). Este péptido fue el que presentó menos interacciones y la mayor energía de enlace (-8.191 kcal/mol) (Cuadro 35).

Cuadro 34. Inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV por los péptidos purificados a partir de la fracción FA1-5 del genotipo ICC3761.

Péptido	Dipeptidil Peptidasa IV
	IC₅₀ (µg/mL)
FEI, FEL, FIE	4.20 ± 0.47 ^a
FKN	12.08 ± 0.23 ^c
FGKG	7.29 ± 0.55 ^b
MEE	7.65 ± 0.17 ^b

Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey.

Cuadro 35. Energía total, energía de interacción y número de interacciones totales obtenidas por modelado computacional de los péptidos purificados y la enzima dipeptidil peptidasa IV

Péptido	Energía Total (kcal/ mol)	Energía de Unión (kcal/ mol)	Interacciones Totales	Puentes de Hidrógeno
FEI	-1400.484	-8.307	8	2
FEL	-1398.894	-12.698	9	5
FIE	-1395.330	-13.054	10	1
FKN	-1336.109	-8.191	6	4
FGKG	-1408.457	-11.684	14	6
MEE	-1394.644	-11.301	11	9

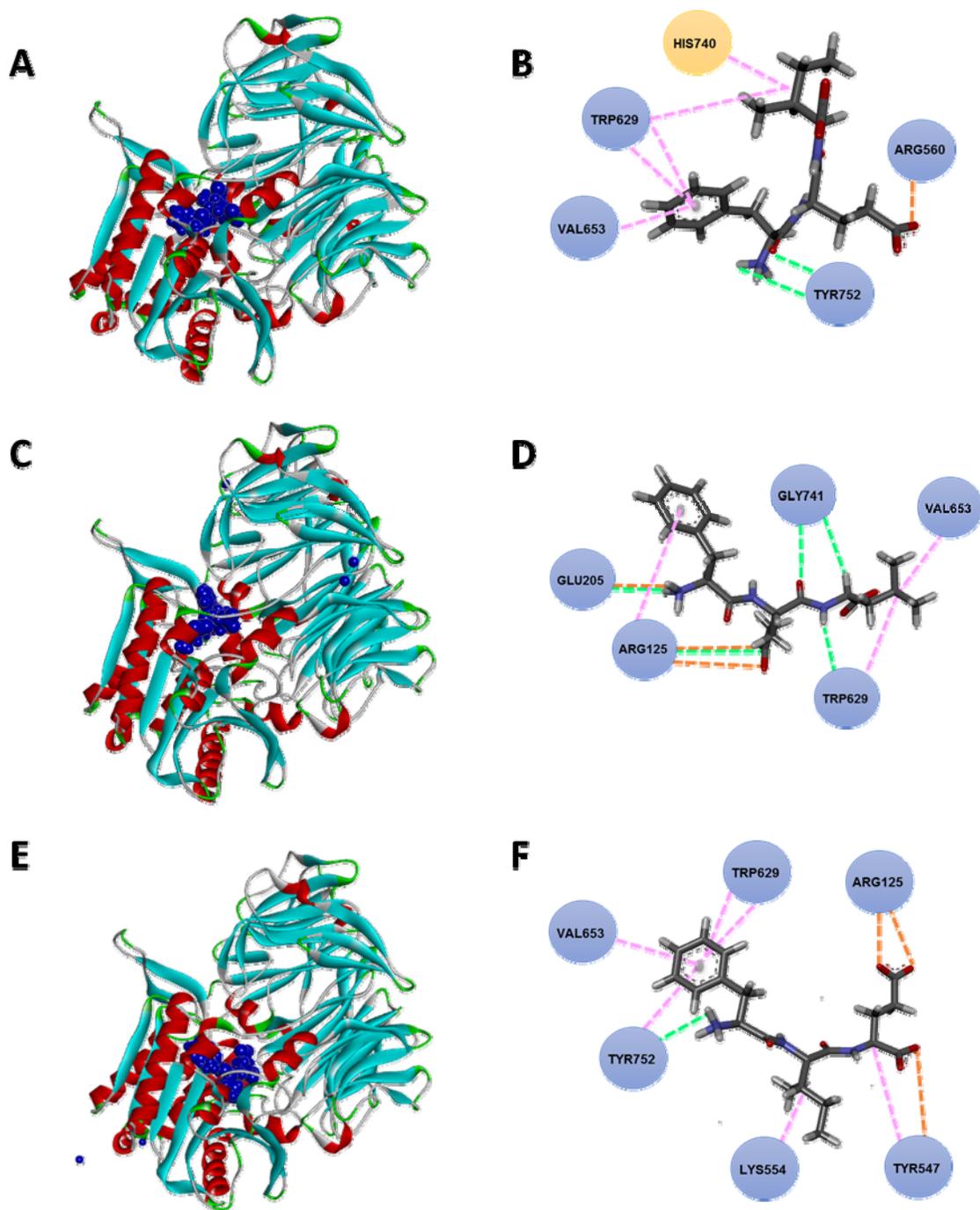


Fig 31. Acoplamiento molecular de diversos péptidos con DPP4: FEI (A y B), FEL (C y D) y FIE (E y F). Interacciones electroestáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas).

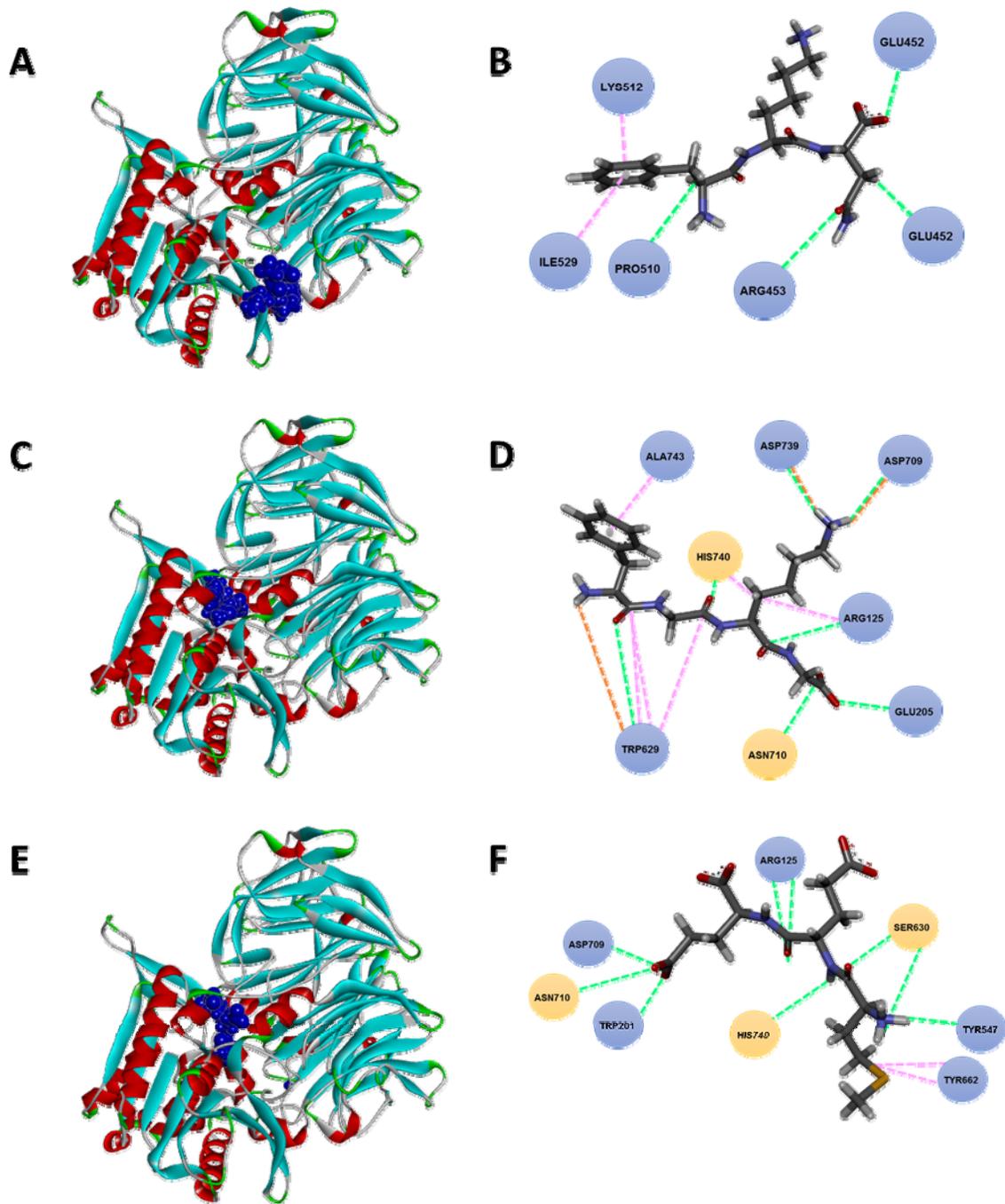


Fig 32. Acoplamiento molecular de diversos péptidos con DPP4: FKN (A y B), FGKG (C y D) y MEE (E y F). Interacciones electrostáticas (líneas discontinuas naranjas), interacciones por puente de hidrógeno (líneas discontinuas verdes), interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas rosas).

El péptido FGKG mostró el mayor número de interacciones (14), entre las cuales se incluyen aminoácidos catalíticos como ASN⁷¹⁰ (puente de hidrógeno) e HIS⁷⁴⁰ (hidrofóbica), así como aminoácidos del S2 como ARG¹²⁵ (hidrofóbicas) y GLU²⁰⁵ (puentes de hidrógeno) (Fig. 32; ANEXO 5). Este último aminoácido es indispensable para que la enzima reconozca el extremo N-terminal del residuo de prolina del sustrato (Abbott y col, 1999).

De los seis péptidos, solo MEE formó enlaces con los tres aminoácidos de la triada catalítica de la enzima (SER⁶³⁰, ASN⁷¹⁰ y HIS⁷⁴⁰), correspondientes a puentes de hidrógeno con MET¹, GLU³ y MET¹, respectivamente. También formó puentes de hidrógeno con el aminoácido ARG¹²⁵ del S2 e interacciones hidrofóbicas con el anillo fenol de TYR⁶⁶² del S1 (Fig. 32; ANEXO 5).

Las interacciones observadas entre los péptidos purificados y DPP4 (con excepción de FKN) se han reportado previamente para inhibidores comerciales como Diprotina A y Sitagliptina (Hiramatsu y col, 2004; Patel y Ghate, 2014), lo que convierte a estos péptidos en una buena alternativa para su uso comercial.

VII CONCLUSIONES

- Los genotipos de garbanzo mostraron una amplia variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos, proteína, péptidos y AA, lo cual refleja su gran diversidad genética.
- Algunos genotipos mostraron contenidos altos de flavonoides (ICC 4418, ICC 6306, ICC 3761) y ácidos fenólicos (Surutato 77, Bco. Sin. 92 y Blanoro) por lo que representan una buena fuente de compuestos antioxidantes.
- La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los genotipos de garbanzo está asociada principalmente con el contenido de los ácidos fenólicos sinápico hexósido y gálico, así como de los flavonoides miricetina, quercetina, catequina e isoramnetina.
- Los perfiles de proteínas mostraron una mayor acumulación de la fracción de globulinas, con una mayor proporción de la proteína legumina A2, mientras que la fracción de albúminas presentó una mayor variabilidad entre los genotipos y una mayor proporción de albúmina 2S.
- Los hidrolizados con alcalasa de la fracción de albúminas presentaron mayor AA que los hidrolizados de la fracción de globulinas, lo que sugiere una mayor proporción de péptidos antioxidantes en las albúminas.
- El genotipo de garbanzo desi ICC3761 representa una buena fuente de péptidos con actividades biológicas (antioxidante y antidiabética), lo que lo hace candidato para ser incluido en la dieta o en programas de mejoramiento para el desarrollo de genotipos de garbanzo con propiedades nutracéuticas.
- Los péptidos purificados a partir del genotipo ICC3761 mostraron altos porcentajes de inhibición de radicales antioxidantes (ABTS y DPPH) y enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (α -amilasa y α -glucosidasa) y diabetes tipo 2 (Dipeptidil peptidasa IV), por lo que podrían ser utilizados como parte de tratamientos no farmacológicos contra enfermedades relacionadas al estrés oxidativo y diabetes.

- Los resultados obtenidos demuestran que los genotipos de garbanzo estudiados representan una buena fuente de compuestos con actividad antioxidante y antidiabética, dándole un valor agregado a este cultivo tan importante para el noroeste de México y el mundo. Además, la variabilidad observada en las características evaluadas sugiere que algunos de estos materiales son buenos candidatos para ser utilizados en el mejoramiento de la calidad nutracéutica del garbanzo.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Garcia B, Berrueta LA, Garmon-Lobato S, Gallo B y Vicente F. 2009. A General Analytical Strategy for the Characterization of Phenolic Compounds in Fruit Juices by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection Coupled to Electrospray Ionization and Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216(28):5398-5415.
- Abbo S, Berger J y Turner N. 2003. Evolution of Cultivated Chickpea: Four Bottlenecks Limit Diversity and Constrain Adaptation. *Functional Plant Biology* 30:1081-1087.
- Abbo S, Molina C, Jungmann R, Grusak MA, Berkovitch Z, Reifen R, Kahl G, Winter P y Reifen R. 2005. Quantitative Trait Loci Governing Carotenoid Concentration and Weight in Seeds of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111(2):185-195.
- Abbott CA, McCaughan GW y Gorrell MD. 1999. Two Highly Conserved Glutamic Acid Residues in the Predicted B Propeller Domain of Dipeptidyl Peptidase IV are Required for Its Enzyme Activity. *FEBS Letters* 458(3):278-284.
- Aguilera Y, Duenas M, Estrella I, Hernandez T, Benitez V, Esteban RM y Martín-Cabrejas MA. 2011a. Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as Affected by a Dehydration Process. *Plant Foods for Human Nutrition* 66(2):187-195.
- Aguilera Y, Estrella I, Benitez V, Esteban RM y Martín-Cabrejas MA. 2011b. Bioactive Phenolic Compounds and Functional Properties of Dehydrated Bean Flours. *Food Research International* 44(3):774-780.
- Aispuro-Pérez A, López-Ávalos J, García-Páez F, Montes-Avila J, Picos Corrales L, Ochoa-Terán A, Bastidas P, Montaña S, Zamora L, Osuna-Martínez L y Sarmiento Sanchez JI. 2019. Synthesis and Molecular Docking Studies of Imines as α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 94:103491.
- Akihisa T, Nishimura Y, Nakamura N, Roy K, Ghosh P, Thakur S y Tamura T. 1992. Sterols of *Cajanus cajan* and Three Other Leguminosae Seeds. *Phytochemistry* 31(5):1765-1768.

- Alshikh N, de Camargo AC y Shahidi F. 2015. Phenolics of Selected Lentil Cultivars: Antioxidant Activities and Inhibition of Low-Density Lipoprotein and DNA Damage. *Journal of Functional Foods* 18:1022-1038.
- Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Robredo S, Troszyńska A, Kosińska A y Pegg RB. 2010. Free Radical-Scavenging Capacity, Antioxidant Activity, and Phenolic Composition of Green Lentil (*Lens Culinaris*). *Food Chemistry* 121(3):705-711.
- Andersen OM y Markham KR. 2005. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. 1st ed, Boca Raton, FL, USA. 1256 p.
- Anderson JW, Smith BM y Washnock CS. 1999. Cardiovascular and Renal Benefits of Dry Bean and Soybean Intake. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70(3 Suppl):464s-474s.
- Anderson NL y Anderson NG. 1998. Proteome and Proteomics: New technologies, New Concepts, and New Words. *Electrophoresis* 19(11):1853-1861.
- Andersson I y Taylor TC. 2003. Structural Framework for Catalysis and Regulation in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414(2):130-140.
- AOAC. 2012. AOAC Official Method 960.52. Microchemical Determination of Nitrogen. Micro-Kjeldahl Method. En: Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International Gaithersburg, MA.
- Ardisson Korat AV, Willett WC y Hu FB. 2014. Diet, Lifestyle, and Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes: A Review from the Nurses' Health Study, Nurses' Health Study 2, and Health Professionals' Follow-Up Study. *Current Nutrition Reports* 3(4):345-354.
- ASERCA. 1997. Garbanzo. *Revista "Claridades Agropecuarias"* 42:1-16.
- Bar-El Dadon S, Pascual CY, Eshel D, Teper-Bamnlker P, Ibanez MD y Reifen R. 2013. Vicilin and the Basic subunit of Legumin are Putative Chickpea Allergens. *Food Chemistry* 138(1):13-18.
- Benigni R. 2005. Structure-Activity Relationship Studies of Chemical Mutagens and Carcinogens: Mechanistic Investigations and Prediction Approaches. *Chemical Reviews* 105(5):1767-1800.

- Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 13(2):184-196.
- Benzie IF y Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239(1):70-76.
- Bhagyawant SS, Gautam AK, Narvekar DT, Gupta N, Bhadkaria A, Srivastava N y Upadhyaya HD. 2018. Biochemical Diversity Evaluation in Chickpea Accessions Employing Mini-Core Collection. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24(6):1165-1183.
- Bhutia SK y Maiti TK. 2008. Targeting Tumors with Peptides from Natural Sources. *Trends in Biotechnology* 26(4):210-217.
- Bovy A, Schijlen E y Hall RD. 2007. Metabolic Engineering of Flavonoids in Tomato (*Solanum lycopersicum*): the Potential for Metabolomics. *Metabolomics* 3:399-412.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME y Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1):25-30.
- Brayer GD, Luo Y y Withers SG. 1995. The Structure of Human Pancreatic Alpha-Amylase at 1.8 Å Resolution and Comparisons with Related Enzymes. *Protein Science* 4(9):1730-1742.
- Brayer GD, Sidhu G, Maurus R, Rydberg EH, Braun C, Wang Y, Nguyen NT, Overall CM y Withers SG. 2000. Subsite Mapping of the Human Pancreatic Alpha-Amylase Active Site Through Structural, Kinetic, and Mutagenesis Techniques. *Biochemistry* 39(16):4778-4791.
- Brown RE, Jarvis KL y Hyland KJ. 1989. Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances. *Analytical Biochemistry* 180(1):136-139.
- Campbell AP y Rains TM. 2014. Dietary Protein is Important in the Practical Management of Prediabetes and Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition* 145(1):164S-169S.

- Casey R, Domoney C y Ellis N. 1986. Legume Storage Proteins and their Genes. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Mifflin BJ (Ed). Oxford University Press, Oxford. p. 1-95.
- Casey R, Domoney C y Smith AM. 1993. Biochemistry and Molecular Biology of Seed Products. En: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. Casey R y Davies DR (Eds). U.K. CAB International, Wallingford, U.K. . p. 121–164.
- Chang Y-W, Alli I, Konishi Y y Ziomek E. 2011. Characterization of Protein Fractions from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Seeds Using Proteomic Techniques. *Food Research International* 44(9):3094-3104.
- Chavan JK, Kadam SS y Salunkhe DK. 1986. Biochemistry and Technology of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 25(2):107-158.
- Chavan JK, Kadam SS y Salunkhe DK. 1989. Chickpea. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization. Salunkhe DK y Kadam SS (Eds). CRC Press, Inc. , Boca Raton, Florida, EUA. . p. 247-288.
- Chavez-Ontiveros J, Quintero-Soto MF, Pineda-Hidalgo KV, Lopez-Moreno HS, Reyes Moreno C, Garzon-Tiznado JA y Lopez-Valenzuela JA. 2020. Microsatellite-Based Genetic Diversity and Grain Quality Variation in Chickpea Genotypes from Mexico and International Collections. *Agrociencia* 54:57-73.
- Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F y Nokihara K. 1996. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(9):2619-2623.
- Chen H, Ma H-R, Gao Y-H, Zhang X, Habasi M, Hu R y Aisa HA. 2015. Isoflavones Extracted from Chickpea *Cicer arietinum* L. Sprouts Induce Mitochondria-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research* 29(2):210-219.
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K y Nokihara K. 1998. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(1):49-53.

- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V y Martens S. 2013. Plant Phenolics: Recent Advances on their Biosynthesis, Genetics, and Ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72:1-20.
- Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista Palomas JD y Millán F. 2000. Factors Affecting the *In Vitro* Digestibility of Chickpea Albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:79-84.
- Cobos M, Rubio J, Fernández-Romero MD, Garza R, Moreno MT, Millan T y Gil J. 2007. Genetic Analysis of Seed Size, Yield and Days to Flowering in a Chickpea Recombinant Inbred Line Population Derived from a Kabuli × Desi Cross. *Annals of Applied Biology* 151:33-42.
- Crispín M y López G. 1976. El Garbanzo: Un Cultivo Importante en México. . En: Instituto Nacional de Investigación Forestal AyP, Sinaloa (INIFAP-SIN) editor. Campo Experimental del Valle de Culiacan (CEVACU): Folleto Tecnico. p. 29-43.
- Crozier A, Jaganath IB y Clifford MN. 2006. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. . En: Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Crozier A, Clifford MN y Ashihara H (Eds). Blackwell publishing, Australia. p. 1-24.
- Cubero JI. 1987. Morphology of Chickpea En: The Chickpea. Saxena MC y Singh KB (Eds). CAB, International, Wallingford, Oxon, UK. p. 35-75.
- Cubero JI. 2002. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2da ed. Grupo Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Das G y Varshney U. 2006. Peptidyl-tRNA Hydrolase and its Critical Role in Protein Biosynthesis. *Microbiology* 152(Pt 8):2191-2195.
- De S, Banerjee S, Kumar SKA y Paira P. 2019. Critical Role of Dipeptidyl Peptidase IV: A Therapeutic Target for Diabetes and Cancer. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 19(2):88-97.
- de Souza Rocha T, Hernandez LMR, Mojica L, Johnson MH, Chang YK y González de Mejía E. 2015. Germination of *Phaseolus vulgaris* and Alcalase Hydrolysis of its Proteins Produced Bioactive Peptides Capable of Improving Markers Related to Type-2 Diabetes *In Vitro*. *Food Research International* 76:150-159.

- de Villiers A, Venter P y Pasch H. 2016. Recent Advances and Trends in the Liquid-Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1430:16-78.
- De Young BJ y Innes RW. 2006. Plant NBS-LRR Proteins in Pathogen Sensing and Host Defense. *Nature Immunology* 7(12):1243-1249.
- Dhawan K, Malhotra S, Dahiya BS y Singh D. 1991. Seed Protein Fractions and Amino Acid Composition in Gram (*Cicer arietinum*). *Plant Foods for Human Nutrition* 41(3):225-232.
- Doll R. 1992. The Lessons of Life: Keynote Address to the Nutrition and Cancer Conference. *Cancer Research* 52(7 Suppl):2024s-2029s.
- Donkena KV, Young CYF y Tindall DJ. 2010. Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. *Obstetrics and Gynecology International* 4:14.
- Dueñas M, Estrella I y Hernández T. 2004. Occurrence of Phenolic Compounds in the Seed Coat and the Cotyledon of Peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology* 219(2):116-123.
- Dueñas M, Hernández T y Estrella I. 2007. Changes in the Content of Bioactive Polyphenolic Compounds of Lentils by the Action of Exogenous Enzymes. Effect on their Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 101(1):90-97.
- Duke JA. 1981. Handbook of Legumes of World Economic Importance. 1 ed. Plenum Press, New York. 345 p.
- Dziuba J, Szerszunowicz I, Nałęcz D y Dziuba M. 2014. Proteomic Analysis of Albumin and Globulin Fractions of Pea (*Pisum sativum* L.) Seeds. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 13:181-190.
- Esfandi R, Willmore WG y Tsopmo A. 2019. Peptidomic Analysis of Hydrolyzed Oat Bran Proteins, and their *In Vitro* Antioxidant and Metal Chelating Properties. *Food Chemistry* 279:49-57.
- FAOSTAT. 2020. Food and Agriculture Organization Statistical Database. Disponible en <http://faostat.fao.org>. Consultado el 16 de marzo de 2020.
- Fратиanni F, Cardinale F, Cozzolino A, Granese T, Albanese D, Di Matteo M, Zaccardelli M, Coppola R y Nazzaro F. 2014. Polyphenol Composition and Antioxidant Activity of Different Grass Pea (*Lathyrus sativus*), Lentils (*Lens*

- culinaris*), and Chickpea (*Cicer arietinum*) Ecotypes of the Campania Region (Southern Italy). *Journal of Functional Foods* 7:551-557.
- Fuentes-Zaragoza E, Riquelme-Navarrete MJ, Sánchez-Zapata E y Pérez-Álvarez JA. 2010. Resistant Starch as Functional Ingredient: A Review. *Food Research International* 43(4):931-942.
- García-Mora P, Frias J, Peñas E, Zieliński H, Giménez-Bastida JA, Wiczowski W, Zielińska D y Martínez-Villaluenga C. 2015. Simultaneous Release of Peptides and Phenolics with Antioxidant, ACE-Inhibitory and Anti-Inflammatory Activities from Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L. Var. Pinto) Proteins by Subtilisins. *Journal of Functional Foods* 18:319-332.
- García-Mora P, Martín-Martínez M, Angeles Bonache M, González-Múniz R, Peñas E, Frias J y Martínez-Villaluenga C. 2017. Identification, Functional Gastrointestinal Stability and Molecular Docking Studies of Lentil Peptides with Dual Antioxidant and Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activities. *Food Chemistry* 221:464-472.
- García-Mora P, Peñas E, Frias J, Zieliński H, Wiczowski W, Zielińska D y Martínez-Villaluenga C. 2016. High-Pressure-Assisted Enzymatic Release of Peptides and Phenolics Increases Angiotensin Converting Enzyme I Inhibitory and Antioxidant Activities of Pinto Bean Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(8):1730-1740.
- Garzón-Tiznado J, Heiras Palazuelos M, Moreno R, Campos MC, Vargas FD, Dorado RD, Carrillo JM y Reyes Moreno C. 2013. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Optimized Extruded Desi Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Flours. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 3:38-47.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B y Hankinson SE. 2007. A Prospective Study of Dietary Flavonoid Intake and Incidence of Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Cancer* 121(10):2225-2232.
- Ghribi AM, Sila A, Przybylski R, Nedjar-Arroume N, Makhoulouf I, Blecker C, Attia H, Dhulster P, Bougatef A y Besbes S. 2015. Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Concentrate. *Journal of Functional Foods* 12:516-525.

- Gil C. 2003. La Metodología Proteómica, una Herramienta para la Búsqueda de Función. *Actualidad SEM* 35:12-20.
- Gómez-Garza RM. 1990. Mocerito-88: Nueva Variedad de Garbanzo Blanco para Sinaloa. Folleto Técnico No 12. INIFAP-CIFAP-Sinaloa-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México. 18 p.
- Gómez-Garza RM, Gómez-Gómez L y Salinas-Pérez RA. 2003a. Blanco Sinaloa 92, Variedad de Garbanzo Blanco para Exportación. Folleto Técnico No 24. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México. 20 p.
- Gómez-Garza RM y Salinas-Pérez RA. 2001a. JAMU-96: Variedad de Garbanzo Blanco Cremoso de Hábito Erecto. Folleto Técnico No 20. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México.
- Gómez-Garza RM y Salinas-Pérez RA. 2001b. Progreso-95: Variedad Erecta de Garbanzo Para Exportación. Folleto Técnico No 19. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México. 16 p.
- Gómez-Garza RM, Salinas-Pérez RA y Gómez-Gómez L. 2003b. Suprema 03, Variedad de Garbanzo Blanco para Exportación. Folleto Técnico No. 25. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México. 15 p.
- Gómez Garza RM. 1983. Santo Domingo-82 Nueva Variedad de Garbanzo Blanco para el Pacífico Norte. Folleto Técnico No. 3. SARH-INIFAP-CIAPAN-CEVACU, Culiacán, Sinaloa, México.
- González De Mejía E y Prisecaru VI. 2005. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(6):425-445.
- Gonzalez de Mejia E, Wang W y Dia VP. 2010. Lunasin, with an Arginine-Glycine-Aspartic Acid Motif, Causes Apoptosis to L1210 Leukemia Cells by Activation of Caspase-3. *Molecular Nutrition & Food Research* 54(3):406-414.
- Gorg A, Weiss W y Dunn MJ. 2004. Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics. *Proteomics* 4(12):3665-3685.
- Guéguen J. 1991. Pea and Fababean Proteins. En: Development in Food Proteins. Hudson B (Ed). Elsevier Applied Science., London, U.K. p. 35-78.

- Guo Y, Zhang T, Jiang B, Miao M y Mu W. 2014. The Effects of an Antioxidative Pentapeptide Derived from Chickpea Protein Hydrolysates on Oxidative Stress in Caco-2 and HT-29 Cell Lines. *Journal of Functional Foods* 7(1):719–726.
- Gupta N, Gautam A y Bhagyawant S. 2019. Biochemical Characterisation of Lectin from Wild Chickpea (*Cicer reticulatum* L.) with Potential Inhibitory Action Against Human Cancer Cells. *Journal of Food Biochemistry* 43(2):e12712.
- Gupta S, Mishra SK, Misra S, Pandey V, Agrawal L, Nautiyal CS y Chauhan PS. 2020. Revealing the Complexity of Protein Abundance in Chickpea Root Under Drought-Stress Using a Comparative Proteomics Approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 151:88-102.
- Gutiérrez-Urbe JA, Romo-Lopez I y Serna-Saldívar SO. 2011. Phenolic Composition and Mammary Cancer Cell Inhibition of Extracts of Whole Cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its Anatomical Parts. *Journal of Functional Foods* 3(4):290-297.
- Han H y Baik B-K. 2008. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Lentils (*Lens culinaris*), Chickpeas (*Cicer arietinum* L.), Peas (*Pisum sativum* L.) and Soybeans (*Glycine max*), and their Quantitative Changes During Processing. *International Journal of Food Science & Technology* 43(11):1971-1978.
- Haneishi A, Takagi K, Asano K, Nakamura S, Kagawa N y Yamada K. 2011. Genistein Stimulates the Insulin-Dependent Signaling Pathway. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)* 3:1534-1540.
- Harborne JB. 1980. Plant Phenolics. En: Encyclopedia of Plant Physiology. Bell EA y Charlwood BV (Eds). New Series, Berlin, Alemania. p. 329-402.
- Hartmann R y Meisel H. 2007. Food-Derived Peptides with Biological Activity: from Research to food Applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):163-169.
- Heidarvand L y Maali-Amiri R. 2013. Physio-Biochemical and Proteome Analysis of Chickpea in Early Phases of Cold Stress. *Journal of Plant Physiology* 170(5):459-469.
- Heiras-Palazuelos MJ, Ochoa-Lugo MI, Gutierrez-Dorado R, Lopez-Valenzuela JA, Mora-Rochin S, Milan-Carrillo J, Garzon-Tiznado JA y Reyes-Moreno C. 2013. Technological Properties, Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid

- Content of Pigmented Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64(1):69-76.
- Herbert BR, Sanchez J y Bini L. 1997. Two-Dimensional Electrophoresis: The State of the Art and Future Directions. En: Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Principles and Practice. Wilkins M, Williams K, Appel R y Hochstrasser D (Eds). Springer, Berlin, Heidelberg. p. 13-34.
- Hermans MM, Kroos MA, van Beeumen J, Oostra BA y Reuser AJ. 1991. Human Lysosomal Alpha-Glucosidase. Characterization of The Catalytic Site. *The Journal of Biological Chemistry* 266(21):13507-13512.
- Hilbers MP, Rossi A, Finazzi-Agrò A, Veldink GA y Vliegenthart JF. 1994. The Primary Structure of a Lipoxygenase from the Shoots of Etiolated Lentil Seedlings Derived from its cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1211(2):239-242.
- Hildebrand DF, Hamilton-Kemp TR, Legg CS y Bookjans G. 1988. Plant Lipoxygenases: Occurrence, Properties and Possible Functions. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 7:201-219.
- Hiramatsu H, Yamamoto A, Kyono K, Higashiyama Y, Fukushima C, Shima H, Sugiyama S, Inaka K y Shimizu R. 2004. The Crystal Structure of Human Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV) Complex with Diprotin A. *Biological Chemistry* 385(6):561-564.
- Huïsmán J y Van der Poel AFB. 1994. Aspects of the Nutritional Quality and Use of Cool Season food Legumes in Animal Feed. En: Proceedings of the Second International Food Legume Research Conference on pea, lentil, faba bean, chickpea, and grasspea Muehlbauer FJ y Kaiser WJ (Eds). Kluwer Academic Publishers, Cairo, Egipto. p. 53-76.
- ICRISAT. 2020. Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para los Trópicos Semiáridos. Disponible en www.icrisat.org. Consultado el 16 de marzo de 2020.
- Ishimaru K, Nonaka G-I y Nishioka I. 1987. Tannins and Related Compounds. LV. Isolation and Characterization of Acutissimins A and B, Novel Tannins from *Quercus* and *Castanea* Species. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 35(2):602-610.

- Ito K, Murakami R, Mochizuki M, Qi H, Shimizu Y, Miura K-i, Ueda T y Uchiumi T. 2012. Structural Basis for the Substrate Recognition and Catalysis of Peptidyl-tRNA Hydrolase. *Nucleic Acids Research* 40(20):10521-10531.
- Jadhav AA, Rayate SJ, Mhase LB, Thudi M, Chitikineni A, Harer PN, Jadhav AS, Varshney RK y Kulwal PL. 2015. Marker-trait Association Study for Protein Content in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Genetics* 94(2):279-286.
- Jaiswal D, Ray D, Subba P, Gayali S, Datta A, Chakraborty S y Chakraborty N. 2012. Proteomic Analysis Reveals the Diversity and Complexity of Membrane Proteins in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Proteome Science* 10:59.
- James MG, Denyer K y Myers AM. 2003. Starch Synthesis in the Cereal Endosperm. *Current Opinion in Biotechnology* 6(3):215-222.
- Jansen RK, Wojciechowski MF, Sanniyasi E, Lee S-B y Daniell H. 2008. Complete Plastid Genome Sequence of the Chickpea (*Cicer arietinum*) and the Phylogenetic Distribution of Rps12 and ClpP Intron Losses Among Legumes (*Leguminosae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(3):1204-1217.
- Johnson IT. 2003. Antioxidants and Antitumor Properties. En: Antioxidants in Food. Pokormy J, Yanishlieva N y Gordon M (Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA. p. 100-123.
- Kadam SS, Deshpande SS y Jambhale ND. 1989. Seed Structure and Composition. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization. Salunkhe DK y Kadam SS (Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA. p. 97-109.
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Ioannou M, Karathanos VT, Hassapidou M y Andrikopoulos NK. 2010. Nutritional Evaluation and Bioactive Microconstituents (Phytosterols, Tocopherols, Polyphenols, Triterpenic Acids) in Cooked dry Legumes Usually Consumed in the Mediterranean Countries. *Food Chemistry* 121(3):682-690.
- Kasetti RB, Rajasekhar MD, Kondeti VK, Fatima SS, Kumar EG, Swapna S, Ramesh B y Rao CA. 2010. Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Activities of Methanol:Water (4:1) Fraction Isolated from Aqueous Extract of *Syzygium*

- Alternifolium Seeds in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Food Chemical Toxicology* 48(4):1078-1084.
- Kaur K, Grewal SK, Gill PS y Singh S. 2019. Comparison of Cultivated and Wild Chickpea Genotypes for Nutritional Quality and Antioxidant Potential. *Journal of Food Science and Technology* 56(4):1864-1876.
- Kemal SA, Krimi Bencheqroun S, Hamwieh A y Imtiaz M. 2017. Effects of Temperature Stresses on the Resistance of Chickpea Genotypes and Aggressiveness of *Didymella rabiei* Isolates. *Frontiers in Plant Science* 8:1607-1607.
- Kenyon G, DeMarini D, Fuchs E, Galas D, Kirsch J, Leyh T, Moos W, Petsko G, Ringe D, Rubin G y Sheahan L. 2002. Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era: Workshop Report. *Molecular and Cellular Proteomics* 1:763-780.
- Kim M, Kim E, Kwak HS y Jeong Y. 2014. The Ingredients in Saengshik, a Formulated Health Food, Inhibited the Activity of Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase as Anti-Diabetic Function. *Nutrition Research and Practice* 8(5):602-606.
- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Helleovaara M, Teppo L, Pukkala E y Aromaa A. 1997. Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms. *American journal of Epidemiology* 146(3):223-230.
- Knights EJ. 1994. Chickpea Industry. En: Australian Grains: a Complete Reference Book on the Grain Industry. Coombs B (Ed). Morescope Publishing, Camberwell, Australia. p. p 436-441.
- Kou X, Gao J, Xue Z, Zhang Z, Wang H y Wang X. 2013. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Albumin Hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology* 50(2):591-598.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE y Etherton TD. 2002. Bioactive Compounds in Foods: their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine* 113(Suppl 9B):71s-88s.

- Kushi LH, Meyer KA y Jacobs DR, Jr. 1999. Cereals, Legumes, and Chronic Disease Risk Reduction: Evidence from Epidemiologic Studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70(3 Suppl):451s-458s.
- Labdi M, Roberson LD, Singh KB y Charrier A. 1996. Genetic Diversity and Hylogenetic Relationships Among the Annual *Cicer* Species as Revealed by Isozymepolymorphism. *Euphytica* 88:181-188.
- Ladizinsky G. 1975. A New *Cicer* from Turkey. Notes of the Royal Botanic Garden. *Euphytica* 25:211-217.
- Ladizinsky G. 1995. Chickpea. En: Evolution of Crop Plants. Smartt J y Simmonds NW (Eds). Logman Scientific and Technical, Harlow, England, United Kingdom. p. 258-261.
- Ladizinsky G y Adler A. 1976. Genetic Relationships Among the Annual Species of *Cicer* L. *Theoretical and Applied Genetics* 48(4):197-203.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lafarga T y Hayes M. 2014. Bioactive Peptides from Meat Muscle and by-Products: Generation, Functionality and Application as Functional Ingredients. *Meat Science* 98(2):227-239.
- Lee S-J, Cheong SH, Kim Y-S, Hwang J-W, Kwon H-J, Kang S-H, Moon S-H, Jeon B-T y Park P-J. 2013. Antioxidant Activity of a Novel Synthetic Hexa-Peptide Derived from an Enzymatic Hydrolysate of Duck Skin by-Products. *Food and Chemical Toxicology* 62:276-280.
- Leong LP y Shui G. 2002. An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry* 76(1):69-75.
- Li P, Shi X, Wei Y, Qin L, Sun W, Xu G, Xu T y Liu T. 2015. Synthesis and Biological Activity of Isoflavone Derivatives from Chickpea as Potent Anti-Diabetic Agents. *Molecules* 20(9):17016-17040.
- Li Y, Wu GZ, Zhang JS y Ma H. 2007. Effects of the Isoflavone Extract on *Cicer arietium* L. on Blood Glucose Level and Oxidation-Antioxidation Status in Diabetic Mice. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 11:7625-7629.

- Liu LH, Hung TV y Bennett L. 2008. Extraction and Characterization of Chickpea (*Cicer arietinum*) Albumin and Globulin. *Journal of Food Science* 73(5):C299-305.
- Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nussler AK y Liu L. 2010. Quercetin Protects Against Ethanol-Induced Oxidative Damage in Rat Primary Hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 24(2):516-522.
- London N, Raveh B, Cohen E, Fathi G y Schueler-Furman O. 2011. Rosetta FlexPepDock Web Server-High Resolution Modeling of Peptide-Protein Interactions. *Nucleic Acids Research* 39(Web Server issue):W249-W253.
- López García H y Andrade Arias E. 1979. SURUTATO 77: Nueva Variedad de Garbanzo Tolerante a "Rabia". . SARH-INIFAP-CIAS, Culiacán, Sinaloa, México.
- Magalhaes SC, Taveira M, Cabrita AR, Fonseca AJ, Valentao P y Andrade PB. 2017. European Marketable Grain Legume Seeds: Further Insight Into Phenolic Compounds Profiles. *Food Chemistry* 215:177-184.
- Manjarrez SP, Gómez-Garza RM, Salinas PRA, Gómez GL y Armenta SLL. 2004. Blanco Sinaloa 92: Caso Exitoso de Mejoramiento Genético de Garbanzo en Sinaloa. Folleto para Productores No 52. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-C.E. Valle de Culiacán. 21 p.
- Marathe SA, Rajalakshmi V, Jamdar SN y Sharma A. 2011. Comparative Study on Antioxidant Activity of Different Varieties of Commonly Consumed Legumes in India. *Food and Chemical Toxicology* 49(9):2005-2012.
- Martin GB, Bogdanove AJ y Sessa G. 2003. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54(1):23-61.
- Martínez-Maqueda D, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Miralles B y Gómez-Ruiz J. 2013. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. En: *Proteomics in Foods*. Toldrá F y Nolle L (Eds). Springer, Boston, MA. p. 21-49.
- Medrano A y del Castillo M. 2011. Obtención de Péptidos Antioxidantes de Glicinina de Soja. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay* 6:32-36.
- Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F y Vioque J. 2007. Affinity Purification of Copper Chelating Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10):3949-3954.

- Mejri L, Vásquez-Villanueva R, Hassouna M, Marina ML y García MCJFri. 2017. Identification of Peptides with Antioxidant and Antihypertensive Capacities by RP-HPLC-Q-TOF-MS in Dry Fermented Camel Sausages Inoculated with Different Starter Cultures and Ripening Times. *Food Research International* 100:708-716.
- Mekky R, Contreras MdM, Elgindi M, Abdel-Monem A, Abdel-sattar E y Segura Carretero A. 2015. Profiling of Phenolic and Other Compounds from Egyptian Cultivars of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Antioxidant Activity: A Comparative Study. *RSC Advances* 5:17751-17767.
- Meotti FC, Senthilmohan R, Harwood DT, Missau FC, Pizzolatti MG y Kettle AJ. 2008. Myricitrin as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase: Implications for the Pharmacological Effects of Flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 44(1):109-120.
- Milan-Noris AK, Gutierrez-Uribe JA, Santacruz A, Serna-Saldivar SO y Martinez-Villaluenga C. 2018. Peptides and Isoflavones in Gastrointestinal Digests Contribute to the Anti-Inflammatory Potential of Cooked or Germinated Desi and Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry* 268:66-76.
- Minkiewicz P, Dziuba J, Darewicz M, Iwaniak A, Dziuba M y cz D. 2008a. Food Peptidomics. *Food Technology and Biotechnology* 46:1-10.
- Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M y Darewicz M. 2008b. BIOPEP Database and Other Programs for Processing Bioactive Peptide Sequences. *Journal of AOAC International* 91(4):965-980.
- Mojica L, Chen K y González de Mejía E. 2015. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. *Journal of Food Science* 80(1):H188-H198.
- Mojica L, Gonzalez de Mejia E, Granados-Silvestre MÁ y Menjivar M. 2017. Evaluation of the Hypoglycemic Potential of a Black Bean Hydrolyzed Protein Isolate and its Pure Peptides Using *In Silico*, *In Vitro* and *In Vivo* Approaches. *Journal of Functional Foods* 31:274-286.

- Morales-Gómez JA. 1999. Tequi Blanco 98 y Desierto 98. Nuevas Variedades de Garbanzo para Sonora. Folleto Técnico No 20. INIFAP-CECH, Hermosillo, Sonora, México. 18 p.
- Morales-Gómez JA y García JR. 1993. Pitic 93 y Hermosillo 93 Nuevas Variedades de Garbanzo para la Costa de Hermosillo. Folleto Técnico No 10. INIFAP-CIRNO-CECH, Hermosillo, Sonora, México. 16 p.
- Morales Gómez JA, Manjarrez Sandoval P, Castillo Torres N, Salinas Pérez R, Montoya Coronado L y Padilla Valenzuela I. 2005. COSTA 2004: Nueva Variedad de Garbanzo Blanco para la Costa de Hermosillo. Folleto Técnico No. 28. INIFAP-CIRNO-CECH, Hermosillo, Sonora, México. 20 p.
- Moure A, Domínguez H y Parajó JC. 2006. Antioxidant Properties of Ultrafiltration-Recovered Soy Protein Fractions from Industrial Effluents and their Hydrolysates. *Process Biochemistry* 41(2):447-456.
- Nagana Gowda GA, Alvarado LZ y Raftery D. 2017. Chapter 5 - Metabolomics. En: Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. Fourth ed. Coulston AM, Boushey CJ, Ferruzzi MG y Delahanty LM (Eds). Academic Press, London, United Kingdom. p. 103-122.
- Nahoum V, Roux G, Anton V, Rouge P, Puigserver A, Bischoff H, Henrissat B y Payan F. 2000. Crystal Structures of Human Pancreatic Alpha-Amylase in Complex with Carbohydrate and Proteinaceous Inhibitors. *The Biochemical Journal* 346 Pt 1:201-208.
- Nei M, Tajima F y Tateno Y. 1983. Accuracy of Estimated Phylogenetic Trees from Molecular Data. II. Gene Frequency Data. *Journal of Molecular Evolution* 19(2):153-170.
- Nelson DL y Cox MM. 2009. Lehninger. Principios de Bioquímica. Quinta ed. Ediciones Omega, España. 1158 p.
- Nugent AP. 2005. Health Properties of Resistant Starch. *British Nutrition Foundation* 30(1):27-54.
- Oomah BD, Caspar F, Malcolmson LJ y Bellido A-S. 2011. Phenolics and Antioxidant Activity of Lentil and Pea Hulls. *Food Research International* 44(1):436-441.

- Oplinger ES, Hardman LL, Oelke EA, Kaminski AR, Schulte EE y Doll JD. 1997. Chickpea (Garbanzo Bean). *Alternative Field Crops Manual*. University of Wisconsin, Madison, WI, EUA.
- Ortega-Murrieta, Fierros-Leyva, Padilla-Valenzuela, Valenzuela-Herrera, Acosta-Gallegos, Gutiérrez-Perez, Velarde-Félix y Rodríguez-Cota. 2016. Blanoro, Nueva Variedad de Garbanzo Blanco de Grano Extra Grande para Exportación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:209-216.
- Oseguera-Toledo ME, Gonzalez de Mejia E y Amaya-Llano SL. 2015. Hard-to-Cook Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins Hydrolyzed by Alcalase and Bromelain Produced Bioactive Peptide Fractions that Inhibit Targets of Type-2 Diabetes and Oxidative Stress. *Food Research International* 76(Pt 3):839-851.
- Oseguera Toledo ME, Gonzalez de Mejia E, Sivaguru M y Amaya-Llano SL. 2016. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein-Derived Peptides Increased Insulin Secretion, Inhibited Lipid Accumulation, Increased Glucose Uptake and Reduced the Phosphatase and Tensin Homologue Activation *In Vitro*. *Journal of Functional Foods* 27:160-177.
- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM. 1995. The Red Wine Phenolics Trans-Resveratrol and Quercetin Block Human Platelet Aggregation and Eicosanoid Synthesis: Implications for Protection Against Coronary Heart Disease. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry* 235(2):207-219.
- Parmar N, Singh N, Kaur A, Viridi AS y Thakur S. 2016. Effect of Canning on Color, Protein and Phenolic Profile of Grains from Kidney Bean, Field Pea and Chickpea. *Food Research International* 89(Pt 1):526-532.
- Patel BD y Ghatge MD. 2014. Recent Approaches to Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 74:574-605.
- Patton WF. 2000. A Thousand Points of Light: the Application of Fluorescence Detection Technologies to Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Proteomics. *Electrophoresis* 21(6):1123-1144.

- Pauff JM y Hille R. 2009. Inhibition Studies of Bovine Xanthine Oxidase by Luteolin, Silibinin, Quercetin, and Curcumin. *Journal of Natural Products* 72(4):725-731.
- Pennington JAT y Fisher RA. 2010. Food Component Profiles for Fruit and Vegetable Subgroups. *Journal of Food Composition and Analysis* 23(5):411-418.
- Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME y Berset C. 2003. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(10):1007.
- Pittaway JK. 2006. Chickpeas and Human Health: The Effect of Chickpea Consumption on Some Physiological and Metabolic Parameters. Masters, University of Tasmania Library, Special & Rare Material Collections.
- Poliwoda A y Wieczorek PP. 2008. Sample Pretreatment Techniques for Oligopeptide Analysis from Natural Sources. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(3):885.
- Prior RL, Wu X y Schaich K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302.
- Pryme IF, Bardocz S, Pusztai A y Ewen SW. 2006. Suppression of Growth of Tumour Cell Lines *In Vitro* and Tumours *In Vivo* by Mistletoe Lectins. *Histology and Histopathology* 21(3):285-299.
- Pundir, Reddy y Mengesha. 1988. ICRISAT Chickpea Germplasm Catalog: Passport Information. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India. 509 p.
- Quideau S. 2009. Chemistry and Biology of Ellagitannins, an Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols. World Scientific, London, United Kingdom. 396 p.
- Quintero-Soto MF. 2015. Identificación de Marcadores Moleculares Asociados al Contenido de Proteínas, Almidón y Fitoquímicos en Genotipos de Garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 103 p.
- Quintero-Soto MF, Saracho-Peña AG, Chavez-Ontiveros J, Garzon-Tiznado JA, Pineda-Hidalgo KV, Delgado-Vargas F y Lopez-Valenzuela JA. 2018. Phenolic Profiles and their Contribution to the Antioxidant Activity of Selected Chickpea

- Genotypes from Mexico and ICRISAT Collections. *Plant Foods for Human Nutrition* 73(2):122-129.
- Rahfeld J, Schierborn M, Hartrodt B, Neubert K y Heins J. 1991. Are Diprotin A (Ile-Pro-Ile) and Diprotin B (Val-Pro-Leu) Inhibitors or Substrates of Dipeptidyl Peptidase IV? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1076(2):314-316.
- Ramos S. 2008. Cancer Chemoprevention and Chemotherapy: Dietary Polyphenols and Signalling Pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 52(5):507-526.
- Raveh B, London N y Schueler-Furman O. 2010. Sub-Angstrom Modeling of Complexes Between Flexible Peptides and Globular Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78(9):2029-2040.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9-10):1231-1237.
- Real Hernandez LM y Gonzalez de Mejia E. 2019. Enzymatic Production, Bioactivity, and Bitterness of Chickpea (*Cicer arietinum*) Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18:1913-1946.
- Redrejo-Rodriguez M, Tejeda-Cano A, del Carmen Pinto M y Macías P. 2004. Lipoyxygenase Inhibition by Flavonoids: Semiempirical Study of the Structure–Activity Relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 674(1):121-124.
- Rocha-Guzmán NE, Herzog A, González-Laredo RF, Ibarra-Pérez FJ, Zambrano-Galván G y Gallegos-Infante JA. 2007. Antioxidant and Antimutagenic Activity of Phenolic Compounds in Three Different Colour Groups of Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* 103(2):521-527.
- Rodriguez-Munoz E, Herrera-Ruiz G, Pedraza-Aboytes G y Loarca-Pina G. 2009. Antioxidant Capacity and Antimutagenic Activity of Natural Oleoresin From Greenhouse Grown Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Foods for Human Nutrition* 64(1):46-51.
- Roig-Zamboni V, Cobucci-Ponzano B, Iacono R, Ferrara MC, Germany S, Bourne Y, Parenti G, Moracci M y Sulzenbacher G. 2017. Structure of Human Lysosomal

- Acid Alpha-Glucosidase - A Guide for the Treatment of Pompe Disease. *Nature Communications* 8(1):1111.
- Rose JK, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM y Saravanan RS. 2004. Tackling the Plant Proteome: Practical Approaches, Hurdles and Experimental Tools. *The Plant Journal* 39(5):715-733.
- Roy F, Boye JI y Simpson BK. 2010. Bioactive Proteins and Peptides in Pulse Crops: Pea, Chickpea and Lentil. *Food Research International* 43(2):432-442.
- Sabehat A, Lurie S y Weiss D. 1998. Expression of Small Heat-Shock Proteins at Low Temperatures. A Possible Role in Protecting Against Chilling Injuries. *Plant Physiology* 117(2):651-658.
- Saeed A, Darvishzadeh R y Basirnia A. 2013. Simple Sequence Repeat Markers Associated with Agro-Morphological Traits in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zemdirbyste-Agriculture* 100(4):433-440.
- SAGARPA. 2020. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, México. Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob>. Consultado el 17 de Febrero de 2020.
- Saier MH. 2000. A functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2):354-411.
- Salazar-Salas NY, Valenzuela-Ponce L, Vega-Garcia MO, Pineda-Hidalgo KV, Vega-Alvarez M, Chavez-Ontiveros J, Delgado-Vargas F y Lopez-Valenzuela JA. 2017. Protein Changes Associated with Chilling Tolerance in Tomato Fruit with Hot Water Pre-Treatment. *Postharvest Biology and Technology* 134:22-30.
- Sánchez-Chino XM, Jiménez Martínez C, León-Espinosa EB, Garduño-Siciliano L, Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Vásquez-Garzón VR, Baltiérrez-Hoyos R y Dávila-Ortiz G. 2019. Protective Effect of Chickpea Protein Hydrolysates on Colon Carcinogenesis Associated With a Hypercaloric Diet. *Journal of the American College of Nutrition* 38(2):162-170.
- Sánchez-Magaña LM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Valdez-Ortiz A, Milán-Carrillo J y Reyes-Moreno C. 2014. Solid-State Bioconversion of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to

- Improve Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Hypoglycemic Functionality. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65(5):558-564.
- Sánchez-Vioque R, Clemente A, Vioque J, Bautista J y Millán F. 1999. Protein Isolates from Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Chemical Composition, Functional Properties and Protein Characterization. *Food Chemistry* 64(2):237-243.
- Sánchez A y Vázquez A. 2017. Bioactive Peptides: A Review. *Food Quality and Safety* 1(1):29-46.
- Sanz Martínez LC. 1991. Purificación y Caracterización de Isoenzimas de Lipoxigenasa en Garbanzo (*Cicer arietinum*) Var. Pedroxillano. Tesis de Doctorado, Universidad de Sevilla. 155 p.
- Saqib M, Mahmood A, Akram R, Khalid DB, Afzal S y Kamal GM. 2015. Density Functional Theory for Exploring the Structural Characteristics and Their Effects on the Antioxidant Properties. *Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry* 1:65-71.
- Sarmadi BH y Ismail A. 2010. Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. *Peptides* 31:1949-1956.
- Saxena R, Venkaiah K, Anitha P, Venu L y Raghunath M. 2007. Antioxidant Activity of Commonly Consumed Plant Foods of India: Contribution of their Phenolic Content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 58(4):250-260.
- Segev A, Badani H, Kapulnik Y, Shomer I, Oren-Shamir M y Galili S. 2010. Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Colored Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science* 75(2):S115-119.
- Serrano-Sandoval SN, Guardado-Félix D y Gutiérrez-Urbe JA. 2019. Changes in Digestibility of Proteins from Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) Germinated in Presence of Selenium and Antioxidant Capacity of Hydrolysates. *Food Chemistry* 285:290-295.
- Sethy NK, Choudhary S, Shokeen B y Bhatia S. 2006. Identification of Microsatellite Markers from *Cicer reticulatum*: Molecular Variation and Phylogenetic Analysis. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 112(2):347-357.

- Sharma K y Muehlbauer FJ. 2007. Fusarium Wilt of Chickpea: Physiological Specialization, Genetics of Resistance and Resistance Gene Tagging. *Euphytica* 157:1-14.
- Sharma R, Rawat V y Suresh CG. 2017. Genome-Wide Identification and Tissue-Specific Expression Analysis of Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat Gene Family in *Cicer arietinum* (Kabuli Chickpea). *Genomics Data* 14:24-31.
- Silva de Lima SL, Contin Gomes MJ, Pereira da Silva B, Galdin Alves NE, Lopez Toledo RC, Vieira Theodoro JM, de Castro Moreira ME, Correio Bento JA, Zaczuk Bassinello P, Pinto da Matta SL, Gonzalez De Mejía E y Duarte Martino HS. 2019. Whole Flour and Protein Hydrolysate from Common Beans Reduce the Inflammation in BALB/c Mice Fed with High Fat High Cholesterol Diet. *Food Research International* 122:330-339.
- Singh. 1985. Nutritional Quality of Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Current Status and Future Research Needs. *Plant Foods for Human Nutrition* 35(4):339-351.
- Singh y Jambunathan. 1982. Distribution of Seed Protein Fractions and Amino Acids in Different Anatomical Parts of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* 31(4):347-354.
- Singh, Wani, Kaur y Sogi. 2008a. Characterisation and Functional Properties of Proteins of Some Indian Chickpea (*Cicer arietinum*) Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(5):778-786.
- Singh B, Singh JP, Kaur A y Singh N. 2017. Phenolic Composition and Antioxidant Potential of Grain Legume Seeds: A Review. *Food Research International* 101:1-16.
- Singh BP, Vij S y Hati S. 2014. Functional Significance of Bioactive Peptides Derived from Soybean. *Peptides* 54:171-179.
- Singh KB. 1990. Prospects of Developing New Genetic Material and Breeding Methodologies for Chickpea Improvement. En: Present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries. Saxena MC, Cubero JI y Wery J (Eds). CIHEAM, Zaragoza, España. p. 43-50.

- Singh PK, Shrivastava N, Chaturvedi K, Sharma B y Bhagyawant SS. 2016. Characterization of Seed Storage Proteins from Chickpea Using 2D Electrophoresis Coupled with Mass Spectrometry. *Biochemistry Research International* 2016:1049462.
- Singh R, Sharma P, Varshney R, Sharma S y Singh N. 2008b. Chickpea Improvement: Role of Wild Species and Genetic Markers. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 25:267-313.
- Singleton VL, Orthofer R y Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178.
- Siva N, Thavarajah P, Kumar S y Thavarajah D. 2019. Variability in Prebiotic Carbohydrates in Different Market Classes of Chickpea, Common Bean, and Lentil Collected From the American Local Market. *Frontiers in Nutrition* 6:38-38.
- Soares de Castro RJ y Sato HH. 2015. Biologically Active Peptides: Processes for their Generation, Purification and Identification and Applications as Natural Additives in the Food and Pharmaceutical Industries. *Food Research International* 74:185-198.
- Spreitzer RJ y Salvucci ME. 2002. Rubisco: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53:449-475.
- Sreerama YN, Sashikala VB y Pratape VM. 2010. Variability in the Distribution of Phenolic Compounds in Milled Fractions of Chickpea and Horse Gram: Evaluation of their Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(14):8322-8330.
- Sreerama YN, Sashikala VB y Pratape VM. 2012. Phenolic Compounds in Cowpea and Horse Gram Flours in Comparison to Chickpea Flour: Evaluation of their Antioxidant and Enzyme Inhibitory Properties Associated with Hyperglycemia and Hypertension. *Food Chemistry* 133(1):156-162.
- Stanisavljević N, Ilic M, Jovanović Ž, Cupic T, Dabić D, Natić M, Tesic Z y Radovic S. 2015. Identification of Seed Coat Phenolic Compounds from Differently Colored Pea Varieties and Characterization of their Antioxidant Activity. *Archives of Biological Sciences* 67:42-42.

- Stanley DW y Aguilera J. 2007. A Review of Textural Defects in Cooked Reconstituted Legumes -The Influence of Structure and Composition. *Journal of Food Biochemistry* 9:277-323.
- Su G, Ren J, Yang B, Cui C y Zhao M. 2011. Comparison of Hydrolysis Characteristics on Defatted Peanut Meal Proteins Between a Protease Extract from *Aspergillus oryzae* and Commercial Proteases. *Food Chemistry* 126(3):1306-1311.
- Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M y Furuno K. 1999. Anti- and Pro-Oxidative Effects of Flavonoids on Metal-Induced Lipid Hydroperoxide-Dependent Lipid Peroxidation in Cultured Hepatocytes Loaded with Alpha-Linolenic Acid. *Free Radical Biology & Medicine* 27(11-12):1313-1323.
- Sung D-Y, Kaplan F y Guy CL. 2001. Plant Hsp70 Molecular Chaperones: Protein Structure, Gene Family, Expression and Function. *Physiologia Plantarum* 113(4):443-451.
- Sunil C, Agastian P, Kumarappan C y Ignacimuthu S. 2012. *In Vitro* Antioxidant, Antidiabetic and Antilipidemic Activities of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore Bark. *Food and Chemical Toxicology* 50(5):1547-1553.
- Svendsen I, Nicolova D, Goshev I y Genov N. 1994. Primary Structure, Spectroscopic and Inhibitory Properties of a Two-Chain Trypsin Inhibitor from the Seeds of Charlock (*Sinapis arvensis* L.), a Member of the Napin Protein Family. *International Journal of Peptide and Protein Research* 43(5):425-430.
- Tanno K-i y Willcox G. 2006. The Origins of Cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: Early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium B.P. *Vegetation History and Archaeobotany* 15:197-204.
- Tavano OL, da Silva SI, Jr., Demonte A y Neves VA. 2008. Nutritional Responses of Rats to Diets Based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Meal or its Protein Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(22):11006-11010.
- Taylor P y Ford R. 2007. Chickpea. En: Genome mapping and molecular breeding in plants. Vol. 3: Pulses, Sugar and Tuber Crops. Chittaranjan K (Ed). Springer, Switzerland. p. 109-118.

- Tester R y Karkalas J. 2002. Starch. En: Biopolymers. Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryote. Vandamme E, de Beats S y Steinbuchel A (Eds). Weinheim: Wiley-VCH, Glasgow, UK. p. 328-438.
- Torres-Fuentes C, Contreras MdM, Recio I, Alaiz M y Vioque J. 2015. Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. *Food Chemistry* 180:194-202.
- Tovchigrechko A y Vakser IA. 2005. Development and Testing of an Automated Approach to Protein Docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 60(2):296-301.
- Tovchigrechko A y Vakser IA. 2006. GRAMM-X Public Web Server for Protein-Protein Docking. *Nucleic Acids Research* 34(suppl_2):W310-W314.
- Umezawa H, Aoyagi T, Ogawa K, Naganawa H, Hamada M y Takeuchi T. 1984. Diprotins A and B, Inhibitors of Dipeptidyl Aminopeptidase IV, Produced by Bacteria. *The Journal of Antibiotics* 37(4):422-425.
- Ur Rehman N, Rafiq K, Khan A, Ahsan Halim S, Ali L, Al-Saady N, Hilal Al-Balushi A, Al-Busaidi H y Al-Harrasi A. 2019. α -Glucosidase Inhibition and Molecular Docking Studies of Natural Brominated Metabolites from Marine Macro Brown Alga *Dictyopteris hoytii*. *Marine Drugs* 17(12):666.
- Valenzuela-Herrera V, Manjarrez-Sandoval P, Morales-Gómez A, Salinas-Pérez RA, Gómez-Gómez L, Fierros-Leyva GA, Ortega-Murrieta PF, Padilla-Valenzuela I, Ramírez-Soto M, Acosta-Gallegos JA, E. G-P, Velarde-Félix S y Fuentes-Dávila G. 2016. "Jumbo 2010", Cultivar of Chickpea "Kabuli" Type of Extra Large Size from Sinaloa, Mexico. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science* 5(7):277-282.
- van Ooijen G, van den Burg HA, Cornelissen BJC y Takken FLW. 2007. Structure and Function of Resistance Proteins in *Solanaceous* Plants. *Annual Review of Phytopathology* 45(1):43-72.
- Varshney RK, Horres R, Molina C, Nayak S, Jungmann R, Swamy P, Winter P, Jayashree B, Kahl G y Hoisington D. 2007. Extending the Repertoire of Microsatellite Markers for Genetic Linkage Mapping and Germplasm Screening in Chickpea. *Journal of SAT Agricultural Research* 5(1):1-3.

- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Tar'an B, Millan T, Zhang X, Ramsay LD, Iwata A, Wang Y, Nelson W, Farmer AD, Gaur PM, Soderlund C, Penmetsa RV, Xu C, Bharti AK, He W, Winter P, Zhao S, Hane JK, Carrasquilla-Garcia N, Condie JA, Upadhyaya HD, Luo MC, Thudi M, Gowda CL, Singh NP, Lichtenzveig J, Gali KK, Rubio J, Nadarajan N, Dolezel J, Bansal KC, Xu X, Edwards D, Zhang G, Kahl G, Gil J, Singh KB, Datta SK, Jackson SA, Wang J y Cook DR. 2013. Draft Genome Sequence of Chickpea (*Cicer arietinum*) Provides a Resource for Trait Improvement. *Nature Biotechnology* 31(3):240-246.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L y Oomah BD. 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10):4113-4117.
- Vioque J, Sanchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J y Millan F. 1999. Purification and Partial Characterization of Chickpea 2S Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4):1405-1409.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M y Foolad MR. 2007. Heat Tolerance in Plants: An Overview. *Environmental and Experimental Botany* 61(3):199-223.
- Wang H, Ng TB, Ooi VE y Liu WK. 2000. Effects of Lectins with Different Carbohydrate-Binding Specificities on Hepatoma, Choriocarcinoma, Melanoma and Osteosarcoma Cell Lines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32(3):365-372.
- Wang LS, Huang JC, Chen YL, Huang M y Zhou GH. 2015a. Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Duck Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(13):3437-3444.
- Wang R, Gangola MP, Jaiswal S, Baga M, Gaur P y Chibbar R. 2017. Variation in Seed Quality Traits in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their Correlation to Raffinose Family Oligosaccharides Concentration. *Crop Science* 57(3):1594-1602.
- Wang S, Wang D y Liu Z. 2015b. Synergistic, Additive and Antagonistic Effects of *Potentilla Fruticosa* Combined with EGb761 on Antioxidant Capacities and the Possible Mechanism. *Industrial Crops and Products* 67:227-238.

- Wang Y-K, Zhang X, Chen G-L, Yu J, Yang L-Q y Gao Y-Q. 2016. Antioxidant Property and their Free, Soluble Conjugate and Insoluble-Bound Phenolic Contents in Selected Beans. *Journal of Functional Foods* 24:359-372.
- Wei Y, Li P, Li B, Gao J, Wang D, Qin L, Sun W, Xu Y, Shi H, Xu T y Liu T. 2017. Study of the Hypoglycemic Activity of Derivatives of Isoflavones from *Cicer arietinum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017:8746823.
- Wood J y Grusak M. 2007. Nutritional Value of Chickpea. En: Chickpea Breeding and Management. Yadav S, Redden R, Chen W y Sharma B (Eds). CAB International, Wallingford. p. 101-142.
- Wood J, Knights E y Harden S. 2008. Milling Performance in Desi-Type Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects of Genotype, Environment and Seed Size. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:108-115.
- Xu BJ y Chang SK. 2007. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science* 72(2):S159-166.
- Xu BJ, Yuan SH y Chang SK. 2007. Comparative Analyses of Phenolic Composition, Antioxidant Capacity, and Color of Cool Season Legumes and Other Selected Food Legumes. *Journal of Food Science* 72(2):S167-177.
- Xue Z, Gao J, Zhang Z, Yu W, Wang H y Kou X. 2012. Antihyperlipidemic and Antitumor Effects of Chickpea Albumin Hydrolysate. *Plant Foods for Human Nutrition* 67(4):393-400.
- Xue Z, Hou X, Yu W, Wen H, Zhang Q, Li D y Kou X. 2018. Lipid Metabolism Potential and Mechanism of CPe-III From Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 104:126–133.
- Xue Z, Wen H, Zhai L, Yu Y, Li Y, Yu W, Cheng A, Wang C y Kou X. 2015. Antioxidant Activity and Anti-Proliferative Effect of a Bioactive Peptide from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 77:75-81.
- Yamaoka M, Carrillo MJH, Nakahara T y Komiyama K. 1991. Antioxidative Activities of Tocotrienols on Phospholipid Liposomes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(2):114-118.

- Yates J. 2000. Mass Spectrometry from Genomics to Proteomics. *Trends in Genetics* 16(1):5-8.
- You L, Zhao M, Cui C, Zhao H y Yang B. 2009. Effect of Degree of Hydrolysis on the Antioxidant Activity of (*Misgurnus anguillicaudatus*) Protein Hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10:235-240.
- Yust MdM, Millán-Linares MdC, Alcaide-Hidalgo JM, Millán F y Pedroche J. 2012. Hypocholesterolaemic and Antioxidant Activities of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(9):1994-2001.
- Zeeman SC, Smith SM y Smith AM. 2007. The Diurnal Metabolism of Leaf Starch. *The Biochemical Journal* 401(1):13-28.
- Zhang D, Chu L, Liu Y, Wang A, Ji B, Wu W, Zhou F, Wei Y, Cheng Q, Cai S, Xie L y Jia G. 2011a. Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional Theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(18):10277-10285.
- Zhang Q, Tong X, Li Y, Wang H, Wang Z, Qi B, Sui X y Jiang L. 2019. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Alcalase-Hydrolyzed Soybean (*Glycine max* L.) Hydrolysate and Their Cytoprotective Effects in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(20):5772-5781.
- Zhang T, Li Y, Miao M y Jiang B. 2011b. Purification and Characterisation of a New Antioxidant Peptide from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates. *Food Chemistry* 128(1):28-33.
- Zhao Y, Du SK, Wang H y Cai M. 2014. *In Vitro* Antioxidant Activity of Extracts from Common Legumes. *Food Chemistry* 152:462-466.
- Zhu L, Chen J, Tang X y Xiong YL. 2008. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of *in Vitro* Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(8):2714-2721.
- Zia-UI-Haq M, Iqbal S, Ahmad S, Bhangar MI, Wiczowski W y Amarowicz R. 2008. Antioxidant Potential of Desi Chickpea Varieties Commonly Consumed in Pakistan. *Journal of Food Lipids* 15(3):326-342.

ANEXOS

ANEXO 1. Perfil de péptidos del hidrolizado proteínico de la fracción de globulinas del genotipo ICC3761

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG1					
	1	444.54	443.54	VGLR	Antihipertensiva, Antidiabética
	2	444.52	443.52	RLR	Antihipertensiva, Antidiabética
	3	967.86	966.86	VEGSSNSNSS	Antihipertensiva, Antidiabética
	4	246.14	245.14	VQ	Antidiabética
	5	246.15	245.15	VGA	Antihipertensiva, Antidiabética
	6	666.48	665.48	LPARLP	Antihipertensiva, Antidiabética
	7	666.48	665.48	PALLRP	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	8	444.56	443.56	GVIR	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	9	552.36	551.36	SSKIK	Antidiabética
	10	562.36	561.36	KTGKE	Antihipertensiva, Antidiabética
	11	562.36	561.36	SSLKQ	Antidiabética, Antioxidante
	12	562.36	561.36	KAKSE	Antihipertensiva, Antidiabética
	13	562.36	561.36	KMKR	Antihipertensiva, Antidiabética
	14	562.28	561.28	WVEE	Antihipertensiva, Antidiabética
	15	444.56	443.56	RIVG	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG1					
	16	373.48	372.48	AVIA	Antihipertensiva, Antidiabética
	17	373.48	372.48	VVR	Antihipertensiva, Antidiabética
	18	373.48	372.48	AIVA	Antihipertensiva, Antidiabética
	19	373.48	372.48	VAIA	Antihipertensiva, Antidiabética
	20	559.72	558.72	IGILSG	Antihipertensiva, Antidiabética
	21	559.72	558.72	IVAISG	Antihipertensiva, Antidiabética
	22	260.15	259.15	IGA	Antihipertensiva, Antidiabética
	23	444.35	443.35	AILK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	24	294.33	293.33	GAF	Antihipertensiva, Antidiabética
	25	549.66	548.66	FINR	Antidiabética
	26	823.99	822.99	SSLKNCTA	Antidiabética, Antioxidante
FG2					
	27	644.84	643.84	ADVIVK	Antihipertensiva, Antidiabética
	28	644.84	643.84	EGVVLK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	29	479.79	478.79	LLPH	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	30	479.59	478.59	LIHP	Antihipertensiva, Antidiabética
	31	479.46	478.46	PEAY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	32	718.69	717.69	SEQFAH	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	33	479.46	478.46	ILYA	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	34	479.56	478.56	ILFS	Antihipertensiva, Antidiabética
	35	718.83	717.83	LLGNCAK	Antihipertensiva, Antidiabética
	36	718.86	717.86	EVIAWT	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	37	1077.38	1076.38	RVEWLDMK	Antihipertensiva, Antidiabética
	38	718.92	717.92	LASLLTT	Antihipertensiva, Antidiabética
	39	710.96	709.96	IVPRIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	40	710.96	709.96	LVIPRL	Antihipertensiva, Antidiabética
	41	1065.32	1064.32	KAAVGALYSGK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	42	1065.32	1064.32	PGVLMALYNS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante, Antitrombótica

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	43	1065.32	1064.32	KKAVAHQPVS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	44	1065.32	1064.32	SAPVPDLGPVI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica
	45	710.88	709.88	VLPPWV	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	46	1065.19	1064.19	KTAHEEGHR	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	47	1065.19	1064.19	KAVAQYGQSL	Antihipertensiva, Antidiabética
	48	1049.41	1048.41	ADITVSCIPM	Antihipertensiva, Antidiabética
	49	710.51	709.51	VLPLLR	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	50	710.51	709.51	VIPIVGI	Antihipertensiva, Antidiabética
	51	1050.66	1049.66	PSLSIFQKM	Antihipertensiva, Antidiabética
	52	662.34	661.34	MEALAK	Antihipertensiva, Antidiabética
	53	1025.44	1024.44	AQLYPSFAE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	54	1283.65	1282.65	RCFDDDTVLSL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	55	602.36	601.36	IVELE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	56	602.36	601.36	LVQNE	Antihipertensiva, Antidiabética
	57	602.41	601.41	GKRLE	Antihipertensiva, Antidiabética
	58	602.41	601.41	FLPLL	Antihipertensiva, Antidiabética
	59	503.25	502.25	EGNPS	Antihipertensiva, Antidiabética
	60	503.25	502.25	VSNP	Antidiabética
	61	503.36	502.36	TKAAL	Antihipertensiva, Antidiabética
	62	503.36	502.36	KTAAL	Antihipertensiva, Antidiabética
	63	503.36	502.36	TAKIA	Antihipertensiva, Antidiabética
	64	683.91	682.91	KVVKPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	65	683.85	682.85	ARVVAPA	Antihipertensiva, Antidiabética
	66	683.62	682.62	VSEDFS	Antihipertensiva, Antidiabética
	67	683.75	682.75	ARGGWH	Antihipertensiva, Antidiabética
	68	894.01	893.01	TYVTEIPA	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	69	1340.51	1339.51	SVIFEVPQVKGH	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	70	777.06	776.06	RYLIVL	Antihipertensiva, Antidiabética
	71	1129.21	1128.21	DLESLPEGLR	Antihipertensiva, Antidiabética
	72	1129.21	1128.21	DELDTHTVGQD	Antihipertensiva, Antidiabética
	73	1129.21	1128.21	NDQVQKKLR	Antihipertensiva, Antidiabética
	74	1129.21	1128.21	QTIEANLALR	Antihipertensiva, Antidiabética
	75	1129.21	1128.21	LDDVLQSLPE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	76	1693.31	1692.31	FVLTKLVPLKAM CKT	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	77	749.86	748.86	SRNPIY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	78	749.86	748.86	VQINLY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	79	1124.29	1123.29	RPRFLSGKY	Antihipertensiva, Antidiabética
	80	749.76	748.76	EDYGCY	Antihipertensiva, Antidiabética
	81	777.93	776.93	EAMGCGLP	Antihipertensiva, Antidiabética
	82	777.77	776.77	RDYNPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	83	777.77	776.77	EVRSISS	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	84	777.77	776.77	DLSDTNI	Antidiabética
	85	1166.15	1165.15	AENLTYVAVDA	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	86	401.47	400.47	LPDG	Antihipertensiva, Antidiabética
	87	401.47	400.47	RPE	Antihipertensiva, Antidiabética
	88	776.92	775.92	IPAT	Antihipertensiva, Antidiabética
	89	401.12	400.12	VGPE	Antihipertensiva, Antidiabética
	90	401.47	400.47	MNH	Antidiabética
	91	401.41	400.41	LPGD	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica
	92	749.93	748.93	VRGRVY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	93	749.83	748.83	KDPRAY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	94	597.58	596.58	DMSTGS	Antihipertensiva, Antidiabética
	95	597.58	596.58	TYNSI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	96	895.86	894.86	DDDVVGIY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	97	895.86	894.86	GSEQGDRF	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	98	597.78	596.78	KHLSL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	99	896.17	895.17	HLAKKVSL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	100	597.64	596.64	FVFGQ	Antihipertensiva, Antidiabética
	101	1165.81	1164.81	IAKIPELAIPT	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	102	1166.4	1165.4	ADSTGMFTCPH	Antihipertensiva, Antidiabética
	103	1166.4	1165.4	HCQLVYICGM	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	104	1113.25	1112.25	DQDEDmDMD	Antihipertensiva, Antidiabética
	105	445.28	444.28	LLSL	Antidiabética
	106	1067.54	1066.54	KDDPEFTIc	Antidiabética, Antioxidante
	107	1067.54	1066.54	RNTNALYLc	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	108	1124.56	1123.56	RPAELTAGFY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	109	812.92	811.92	KDLHNW	Antidiabética, Antioxidante
	110	812.74	811.74	DQHGKNN	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	111	1219.41	1218.41	EEYDIFKKF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	112	951.1	950.1	SLFPLMSR	Antihipertensiva, Antidiabética
	113	951.1	950.1	AVELSFR	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	114	951.06	950.06	GRVYQTAR	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	115	702.83	701.83	SIVASLL	Antihipertensiva, Antidiabética
	116	577.81	576.81	LNDDT	Antihipertensiva, Antidiabética
	117	865.86	864.86	DFEFGNH	Antihipertensiva, Antidiabética
	118	865.86	864.86	HSRSHEL	Antidiabética, Antioxidante
	119	702.71	701.71	EVLNLD	Antihipertensiva, Antidiabética
	120	865.87	864.87	RKDLYGN	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	121	865.87	864.87	SLDFDRI	Antihipertensiva, Antidiabética
	122	992.13	991.13	WNQSLICK	Atidiabética
	123	992.13	991.13	DGQMAVKSVG	Antihipertensiva, Antidiabética
	124	992.13	991.13	DKGSWGDVK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG2					
	125	1487.69	1486.69	EWIIESGALPCL R	Antihipertensiva, Antidiabética
	126	1487.69	1486.69	CKLWNLQILKLD	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	127	584.79	583.79	FSETT	Atidiabética
	128	584.79	583.79	HVIDT	Atidiabética
	129	866.25	865.25	MYSSCFE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	130	866.25	865.25	VDCGDGGPF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica
	131	866.41	865.41	RNPSFVF	Antihipertensiva, Antidiabética
	132	577.4	576.4	GKFLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	133	577.4	576.4	IFGKI	Antihipertensiva, Antidiabética
	134	288.2	287.2	VGI	Antihipertensiva, Antidiabética
	135	288.2	287.2	RI	Atidiabética
	136	288.2	287.2	GVI	Antihipertensiva, Antidiabética
	137	876.27	875.27	DYYETDA	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
FG3					
	138	332.2	331.2	SII	Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG3					
	139	332.2	331.2	AEL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	140	332.2	331.2	VTI	Antidiabética
	141	332.2	331.2	TVI	Antidiabética
	142	471.29	470.29	TALI	Antidiabética
	143	417.23	416.23	GDLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	144	417.23	416.23	DGIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	145	417.23	416.23	GNNI	Antidiabética
	146	831	830	LSQDAAIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	147	344.26	343.26	VLL	Antidiabética
	148	638.31	637.31	VYNQD	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	149	399.27	398.27	IGPL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica
	150	399.27	398.27	AVPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	151	399.27	398.27	GLPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	152	447.26	446.26	GNGSL	Antihipertensiva, Antidiabética
	153	447.26	446.26	DISI	Antidiabética
	154	344.39	343.39	DPL	Antidiabética
	155	344.39	343.39	PDI	
	156	394.45	393.45	FDI	

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 1. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FG3					
	157	394.2	393.2	FNN	Antidiabética
	158	393.24	392.24	NIF	Antihipertensiva
	159	393.24	392.24	GGFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	160	393.24	392.24	INF	Antihipertensiva, Antidiabética
	161	393.24	392.24	IGGF	Antihipertensiva, Antidiabética
	162	481.3	480.3	TTLF	Antihipertensiva, Antidiabética
	163	481.3	480.3	TTFI	Antihipertensiva, Antidiabética
	164	932.51	931.51	RSLSVVGSK	Antihipertensiva, Antidiabética
	165	932.51	931.51	MLFQLPAL	Antihipertensiva, Antidiabética
	166	916.52	915.52	IMGNGSLKP	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	167	769.52	768.52	TIAALLPA	Antihipertensiva, Antidiabética
	168	394.45	393.45	NGCT	Antihipertensiva, Antidiabética
	169	394.45	393.45	MDE	
	170	394.45	393.45	DFL	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. La posible actividad se obtuvo de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FG1, Fracción de globulinas 1 (5-35 min); FG2, Fracción de globulinas 2 (36-65 min); FG3, Fracción de globulinas 3 (66-95 min). PM, peso molecular.

ANEXO 2. Perfil de péptidos del hidrolizado proteínico de la fracción de albúminas del genotipo ICC3761

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA1					
	1	317.37	318.37	KAT	Antihipertensiva, Antidiabética
	2	246.28	245.28	AGV	Antihipertensiva, Antidiabética
	3	361.41	360.41	SVR	Antihipertensiva, Antidiabética
	4	361.41	360.41	SVVG	Antihipertensiva, Antidiabética
	5	361.41	360.41	VSR	Antidiabética
	6	956.19	955.19	VCTRMDCQ	Antidiabética
	7	1028.51	1027.51	ADATHQPFAA	Antihipertensiva, Antidiabética
	8	754.57	753.57	KLRLPK	Antihipertensiva, Antidiabética
	9	754.58	753.58	RLPKLK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	10	754.57	753.57	KLPRIK	Antihipertensiva, Antidiabética
	11	361.21	360.21	VKD	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	12	361.13	360.13	NNN	Antidiabética
	13	361.13	360.13	MPN	Antidiabética
	14	361.14	360.14	PMN	Antidiabética
	15	374.23	373.23	ARK	Antihipertensiva, Antidiabética
	16	374.22	373.22	AKVG	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA1					
	17	306.15	305.15	CAI	Antihipertensiva
	18	288.38	287.38	RL	Antihipertensiva, Antidiabética
	19	288.19	287.19	GVI	Antihipertensiva, Antidiabética
	20	374.29	373.29	KVK	Antihipertensiva, Antidiabética
	21	374.3	373.3	VKK	Antihipertensiva, Antidiabética
	22	374.23	373.23	NLQ	Antihipertensiva, Antidiabética
	23	374.23	373.23	NLK	Antidiabética, Antioxidante
	24	374.23	373.23	NIAG	Antihipertensiva, Antidiabética
	25	260.13	259.13	IGA	Antihipertensiva, Antidiabética
	26	389.21	388.21	QNK	Antihipertensiva, Antidiabética
	27	389.21	388.21	NKQ	Antihipertensiva
	28	389.21	388.21	IEQ	Antihipertensiva
	29	260.17	259.17	LGA	Antihipertensiva, Antidiabética
	30	480.17	479.17	MDTN	Antidiabética
	31	480.17	479.17	TCSGL	Antihipertensiva, Antidiabética
	32	383.2	382.2	GGHL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	33	574.3	573.3	NIRGD	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	34	574.3	573.3	RISAQ	Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA1					
	35	331.22	330.22	ALK	Antidiabética, Antioxidante
	36	331.22	330.22	IAK	Antihipertensiva, Antidiabética
	37	603.39	602.39	LGTLSS	Antihipertensiva, Antidiabética
	38	574.38	573.38	LRSKA	Antihipertensiva, Antidiabética
	39	383.21	382.21	NHI	Antidiabética
	40	383.15	382.15	GGYS	Antihipertensiva, Antidiabética
	41	383.15	382.15	YSN	Antidiabética
	42	347.13	346.13	CPQ	Antihipertensiva, Antidiabética
	43	331.17	330.17	SPQ	Antihipertensiva, Antidiabética
	44	448.47	447.47	CNDP	Antidiabética
	45	574.19	573.19	SCNNH	Antidiabética
	46	574.36	573.36	LTGKR	Antihipertensiva, Antidiabética
	47	408.22	407.22	FEL	Antioxidante
	48	408.22	407.22	FKN	
	49	408.16	407.16	MEE	Antihipertensiva, Antidiabética
	50	479.54	478.54	FQKG	Antihipertensiva, Antidiabética
	51	408.19	407.19	FEI	Antihipertensiva, Antidiabética
	52	408.19	407.19	FIE	Antihipertensiva
	53	408.19	407.19	LFE	Antihipertensiva
	54	318.13	317.13	NGGA	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA1					
	55	417.29	416.29	RNK	Antihipertensiva, Antidiabética
	56	417.29	416.29	RGGK	Antihipertensiva, Antidiabética
	57	417.29	416.29	LITA	Antidiabética
	58	417.29	416.29	LLAT	Antihipertensiva, Antidiabética
	59	417.19	416.19	QNR	Antidiabética
	60	417.19	416.19	VGEI	Antihipertensiva, Antidiabética
FA2					
	61	359.18	358.18	EPN	Antidiabética
	62	359.22	358.22	ILN	Antihipertensiva, Antidiabética
	63	359.23	358.23	LNI	Antihipertensiva, Antidiabética
	64	316.17	315.17	LPS	Antidiabética
	65	359.22	358.22	IIGG	Antihipertensiva, Antidiabética
	66	1082.4	1081.4	LDACNCDSLE	Antihipertensiva, Antidiabética
	67	603.39	602.39	FPKLV	Antihipertensiva, Antidiabética
	68	506.22	505.22	NSSAQ	
	69	504.58	503.58	NMNK	Antihipertensiva, Antidiabética
	70	506.3	505.3	VFLQ	Antihipertensiva, Antidiabética
	71	506.35	505.35	FVLK	Antihipertensiva, Antidiabética
	72	506.35	505.35	LFVK	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA2					
	73	759.44	758.44	LEASIR	Antihipertensiva, Antidiabética
	74	759.4	758.4	YPVQPVG	Antihipertensiva, Antidiabética
	75	759.48	758.48	KEEIIK	Antihipertensiva, Antidiabética
	76	361.15	360.15	NPM	Antidiabética
	77	361.15	360.15	NMP	Antidiabética
	78	360.17	359.17	VNQ	Antidiabética
	79	360.17	359.17	FPP	Antihipertensiva, Antidiabética
	80	759.4	758.4	YPVQPVG	Antihipertensiva, Antidiabética
	81	361.18	360.18	DGGL	Antihipertensiva, Antidiabética
	82	579.3	578.3	VNSFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	83	727.43	726.43	VGPGGEVI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	84	904.37	903.37	EYTQYSN	Antihipertensiva, Antidiabética
	85	361.18	360.18	NDI	Antidiabética
	86	750.82	749.82	LSGVGGFN	Antihipertensiva, Antidiabética
	87	1014.63	1013.63	EGRKVGIIK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	88	361.17	360.17	NDL	Antidiabética
	89	423.2	422.2	ETSS	Antidiabética
	90	423.2	422.2	YPGS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA2					
	91	687.31	686.31	DESHVT	Antidiabética
	92	687.36	686.36	NEGVRI	Antihipertensiva, Antidiabética
	93	676.47	675.47	KRFLL	Antihipertensiva, Antidiabética
	94	676.47	675.47	QFRIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	95	676.41	675.41	SVKDDI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	96	418.2	417.2	NLGD	Antihipertensiva, Antidiabética
	97	402.22	401.22	GLVN	Antihipertensiva, Antidiabética
	98	358.4	357.4	IPE	Antihipertensiva, Antidiabética
	99	358.2	357.2	PIE	Antihipertensiva, Antidiabética
	100	456.35	455.35	VLPK	Antihipertensiva, Antidiabética
	101	687.34	686.34	SGTVVPK	Antihipertensiva, Antidiabética
	102	522.11	521.11	DGDSE	Antihipertensiva
	103	1116.43	1115.43	DQFPHEWAS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	104	1116.75	1115.75	FSLLSLLPKV	Antihipertensiva, Antidiabética
	105	572.27	571.27	MQYM	Antidiabética
	106	744.58	743.58	LSRKLK	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA2					
	107	1116.72	1115.72	KATSLKVLEQ	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	108	1086.37	1085.37	MEDIMMSTE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	109	745.33	744.33	SHEFPE	Antihipertensiva, Antidiabética
	110	745.33	744.33	QEENIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	111	1117.49	1116.49	QNLEEIEVSG	Antihipertensiva, Antidiabética
	112	487.19	486.19	FSSF	Antihipertensiva, Antidiabética
	113	959.37	958.37	PSCNNHNAC	Antidiabética
	114	959.39	958.39	IVCSGHVMN	Antihipertensiva, Antidiabética
	115	1016.41	1015.41	IACFFIGMD	Antihipertensiva, Antidiabética
	116	715.43	714.43	IDLELL	Antidiabética, Antioxidante
	117	715.44	714.44	IDKILN	Antihipertensiva, Antidiabética
	118	715.46	714.46	LLPIFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	119	715.39	714.39	RSRSPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	120	330.2	329.2	TPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	121	381.17	380.17	QSF	Antihipertensiva, Antidiabética
	122	381.18	380.18	AGSF	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA2					
	123	381.17	380.17	TNF	Antihipertensiva, Antidiabética
	124	381.2	380.2	KAY	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	125	381.21	380.21	KSF	Antihipertensiva, Antidiabética
	126	395.2	394.2	RYG	Antihipertensiva, Antidiabética
	127	732.43	731.43	QLTKSR	Antidiabética
	128	381.17	380.17	TNF	Antihipertensiva, Antidiabética
	129	381.17	380.17	QSF	Antihipertensiva, Antidiabética
	130	365.18	364.18	KSM	Antidiabética
	131	789.46	788.46	ESIAKLE	Antihipertensiva, Antidiabética
	132	286.18	285.18	GPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	133	769.53	768.53	VLQSLIP	Antihipertensiva, Antidiabética
	134	632.33	631.33	SITVVN	Antidiabética
	135	567.27	566.27	HTFY	Antihipertensiva, Antidiabética
	136	567.29	566.29	KSIGY	Antihipertensiva, Antidiabética
	137	1223.3	1222.3	DEMDDPLPGYS	Antihipertensiva, Antidiabética
	138	1157.61	1156.61	AGKLPQVEYHS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA2					
	139	446.22	445.22	SLLN	Antihipertensiva, Antidiabética
	140	1124.51	1123.51	TLAKEcTIDM	Antihipertensiva, Antidiabética
	141	1180.81	1179.81	VAKVLQSLIPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	142	493.23	492.23	CLEE	Antihipertensiva
	143	292.13	291.13	SVS	Antidiabética
	144	292.13	291.13	SAD	Antidiabética
	145	292.13	291.13	EGS	Antihipertensiva, Antidiabética
	146	493.32	492.32	YLVV	Antidiabético, Ansiolítico
	147	446.24	445.24	GASIV	Antihipertensiva, Antidiabética
	148	434.47	433.47	NTTV	Antidiabética
	149	1452.56	1451.56	NLTPSQTLDSC NCG	Antihipertensiva, Antidiabética
	150	857.4	856.4	QGDVGPPE	Antihipertensiva, Antidiabética, Antitrombótica
	151	753.33	752.33	EALCKAE	Antihipertensiva, Antidiabética
	152	288.18	287.18	VGI	Antihipertensiva, Antidiabética
FA3					
	153	1504.98	1503.98	TLFVKGcRNLKII	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	154	1504.01	1503.01	LKRLFNLSASHE F	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	155	1657.88	1656.88	TSLQLPFGKDN VPEL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	156	1105.69	1104.69	LRLRKLPPL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	157	643.32	642.32	DTVPVL	Antihipertensiva, Antidiabética
	158	1594.79	1593.79	EGVKYGAGIGP GVYDI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	159	462.24	461.24	KAFP	Antihipertensiva, Antidiabética
	160	1594.96	1593.96	QQKKLNLPIIPT TT	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	161	1006.45	1005.45	VFGFIACcF	Antihipertensiva, Antidiabética
	162	1578.71	1577.71	KNEENYmVGLH GMG	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	163	956.65	955.65	PKLELMII	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	164	363.19	362.19	VGGM	Antihipertensiva, Antidiabética
	165	322.40	321.40	VCT	
	166	366.16	365.16	CMI	Antidiabético
	167	480.17	479.17	MDT	
	168	330.19	329.19	PTL	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	169	306.14	305.14	GVm	Antihipertensiva, Antidiabética
	170	306.14	305.14	VGm	Antihipertensiva, Antidiabética
	171	1028.60	1027.60	LNIEKGLQN	Antihipertensiva, Antidiabética
	172	1028.52	1027.52	LDATATLGAVP	Antihipertensiva, Antidiabética
	173	964.44	963.44	ATIPAMEMT	Antihipertensiva, Antidiabética
	174	643.44	642.44	RARKL	Antihipertensiva, Antidiabética
	175	964.61	963.61	LVQLNLKH	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	176	964.56	963.56	VEKIVDYV	Antihipertensiva, Antidiabética
	177	302.2	301.2	IGL	Antihipertensiva, Antidiabética
	178	571.31	570.31	IVLNL	Antihipertensiva, Antidiabética
	179	373.21	372.21	APVS	Antihipertensiva, Antidiabética
	180	302.2	301.2	GLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	181	302.2	301.2	AVL	Antihipertensiva, Antidiabética
	182	360.22	359.22	IDL	
	183	360.22	359.22	DII	Antidiabética
	184	360.21	359.21	EVL	Antihipertensiva, Antidiabética
	185	360.17	359.17	NNL	Antidiabética
	186	360.47	359.47	MPI	Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	187	360.47	359.47	PMI	Antidiabética
	188	489.29	488.29	LFLP	Antihipertensiva, Antidiabética
	189	359.21	358.21	NII	Antidiabética
	190	359.21	358.21	GGLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	191	770.58	769.58	KKLRLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	192	770.58	769.58	KKLIRL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	193	360.17	359.17	PML	Antidiabética
	194	360.21	359.21	LDL	
	195	360.21	359.21	DIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	196	360.2	359.2	NNI	Antidiabética
	197	360.24	359.24	EVI	Antihipertensiva, Antidiabética
	198	359.23	358.23	NIL	Antihipertensiva, Antidiabética
	199	429.3	428.3	VLVV	Antidiabética
	200	1283.61	1282.61	QAKVEANPSSP R	Antihipertensiva, Antidiabética
	201	859.25	858.25	CNSMSCQS	Antidiabética
	202	583.37	582.37	QLLPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	203	583.37	582.37	LQLPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	204	874.25	873.25	KPLLCTSI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	205	874.25	873.25	LKPLLCTS	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	206	1283.61	1282.61	NFYQGNLVSIE	Antihipertensiva, Antidiabética
	207	1283.61	1282.61	QAKVEANPSSP R	Antihipertensiva, Antidiabética
	208	875.34	874.34	ACCFVWF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	209	583.52	582.52	IKLPL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	210	875.47	874.47	PASHTIHI	Antidiabético
	211	667.32	666.32	YDGK GK	Antihipertensiva, Antidiabética
	212	421.23	420.23	ITGm	Antihipertensiva, Antidiabética
	213	437.22	436.22	ITFG	Antihipertensiva, Antidiabética
	214	667.41	666.41	QFLFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	215	1523.88	1522.88	SPWRGRARKLA IL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	216	1299.86	1298.86	LVNDLLPKFKL	Antihipertensiva, Antidiabética
	217	867.55	866.55	IKLPLGLN	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	218	667.37	666.37	YDGK GK	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	219	393.23	392.23	NFI	Antihipertensiva, Antidiabética
	220	393.23	392.23	NFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	221	377.18	376.18	NLm	Antidiabético
	222	377.18	376.18	NMI	Antidiabético
	223	1523.97	1522.97	PKIGIDILAERSL V	Antihipertensiva, Antidiabética
	224	366.17	365.17	MCL	
	225	366.18	365.18	HPI	Antihipertensiva, Antidiabética
	226	350.18	349.18	SML	Antidiabético
	227	366.17	365.17	FSL	Antidiabético
	228	366.17	365.17	SFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	229	366.21	365.21	PHL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	230	366.21	365.21	AYI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	231	366.21	365.21	YAL	Antihipertensiva, Antidiabética
	232	481.24	480.24	SDFI	Antihipertensiva, Antioxidante
	233	364.19	363.19	VDM	Antihipertensiva, Antidiabética
	234	364.19	363.19	TIM	Antihipertensiva, Antidiabética
	235	1000.49	999.49	QANNMYLF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	236	336.2	335.2	GIF	Antihipertensiva, Antidiabética
	237	980.38	979.38	TNRDGDSES	Antihipertensiva, Antidiabética
	238	980.38	979.38	QSEEDFP	Antihipertensiva, Antidiabética
	239	336.15	335.15	GLM	Antihipertensiva, Antidiabética
	240	336.15	335.15	IGM	Antihipertensiva
	241	378.22	377.22	VLM	Antihipertensiva
	242	378.22	377.22	IVM	Antihipertensiva
	243	481.24	480.24	SDIF	Antihipertensiva
	244	481.24	480.24	DSIF	Antihipertensiva, Antidiabética
	245	362.22	361.22	VIM	Antidiabético
	246	394.16	393.16	FDL	
	247	394.19	393.19	MLM	Antidiabético
	248	378.17	377.17	DMI	Antihipertensiva, Antidiabética
	249	394.23	393.23	VYL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	250	394.23	393.23	YVL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	251	394.21	393.21	DFI	Antihipertensiva
	252	530.32	529.32	LPSTI	Antidiabética
	253	394.21	393.21	DFI	Antihipertensiva
	254	394.23	393.23	VYL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	255	530.27	529.27	TPSLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	256	530.27	529.27	VVEAI	Antihipertensiva, Antidiabética
	257	530.32	529.32	LPSTI	Antidiabética
	258	530.4	529.4	ALITI	Antidiabética
	259	350.22	349.22	FAL	Antihipertensiva, Antidiabética
	260	350.22	349.22	AFL	Antihipertensiva, Antidiabética
	261	378.17	377.17	MEV	Antihipertensiva, Antidiabética
	262	514.32	513.32	IATPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	263	401.42	400.42	DGIP	Antihipertensiva, Antidiabética
	264	516.27	515.27	MPRL	Antihipertensiva, Antidiabética
	265	1613.58	1612.58	NFADNGCIACM CHNT	Antihipertensiva, Antidiabética
	266	1125.38	1124.38	WDMCKQEDA	Antihipertensiva, Antidiabética
	267	1052.44	1051.44	WNMKNKCTGV	Antihipertensiva, Antidiabética
	268	1671.67	1670.67	WNMKNKCTGVV GVFNC	Antihipertensiva
	269	1686.87	1685.87	WSGEAYLSYSL GALAV	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	270	1686.87	1685.87	VWSGEAYLSYS LGALA	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	271	528.32	527.32	EGLPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	272	613.35	612.35	STHRL	Antihipertensiva, Antidiabética
	273	613.35	612.35	CPPSIP	Antihipertensiva, Antidiabética
	274	358.26	357.26	ILL	Antihipertensiva, Antidiabética
	275	516.18	515.18	DLRL	Antihipertensiva, Antidiabética
	276	493.24	492.24	FDLV	Antidiabética
	277	530.22	529.22	DAPID	Antihipertensiva, Antidiabética
	278	530.31	529.31	AVIDL	Antihipertensiva, Antidiabética
	279	530.31	529.31	IGIDI	Antihipertensiva, Antidiabética
	280	1613.59	1612.59	TFIGGMEAFSSY CNS	Antihipertensiva, Antidiabética
	281	455.32	454.32	IIFI	Antihipertensiva, Antidiabética
	282	530.26	529.26	IGNLN	Antihipertensiva, Antidiabética
	283	1970.73	1969.73	ETNVTCSISLPM QRMSSS	Antidiabética, Antioxidante
	284	1686.64	1685.64	GQDHEEHNNDI EIH	Antihipertensiva, Antidiabética
	285	370.15	369.15	FGM	Antihipertensiva
	286	370.14	369.14	GFF	Antihipertensiva, Antidiabética
	287	370.19	369.19	FGF	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	288	455.32	454.32	LIPL	Antihipertensiva, Antidiabética
	289	530.31	529.31	AVIDL	Antihipertensiva, Antidiabética
	290	530.36	529.36	IGIDL	Antihipertensiva, Antidiabética
	291	569.41	568.41	VPKLI	Antihipertensiva, Antidiabética
	292	549.32	548.32	NFLVG	Antihipertensiva, Antidiabética
	293	549.23	548.23	WTEN	Antihipertensiva, Antidiabética
	294	1196.67	1195.67	ISVTTFREFP	Antihipertensiva, Antidiabética
	295	1196.52	1195.52	MWTENWSGW	Antihipertensiva, Antidiabética
	296	738.49	737.49	ISHLRL	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	297	718.46	717.46	ILTKPF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	298	718.46	717.46	LKTLPF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	299	718.47	717.47	ILKTMI	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante
	300	475.28	474.28	VILM	Antihipertensiva, Antidiabética
	301	738.53	737.53	VPITLPV	Antihipertensiva, Antidiabética

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 2. Continuación...

Fracción	No.	[MH] ⁺ (Da)	PM (Da)	Péptido ¹	Posible Actividad
FA3					
	302	718.38	717.38	QVLDMI	Antihipertensiva, Antidiabética
	303	718.47	717.47	VKPLDF	Antihipertensiva, Antidiabética, Antioxidante

¹Péptidos secuenciados por UPLC-ESI-MS/MS con una intensidad de al menos el 50%. Las posibles actividades se obtuvieron de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) y se le atribuye al péptido completo o a algún fragmento de él. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. FA1, Fracción de albuminas 1 (5-35 min); FA2, Fracción de albuminas 2 (36-65 min); FA3, Fracción de albuminas 3 (66-95 min).

ANEXO 3. Relación de los aminoácidos involucrados en el acoplamiento molecular entre α -amilasa y los péptidos purificados.

No.	Cadena A (α -amilasa)	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
FEI					
1	ASP197:OD2	PHE1:HT2	1.9	Puente de hidrógeno; Electroestática	Puente salino; Atracción por carga
2	LYS200:NZ	GLU:OE2	4.1	Electroestática	Atracción por carga
3	GLU233:OE1	PHE1:N	4.8	Electroestática	Atracción por carga
4	ASP197:OD1	PHE1:HA	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
5	TRP58	PHE1	4.6	Hidrofóbica	Apilamiento pi-pi
6	TRP59	PHE1	4.9	Hidrofóbica	pi-pi en forma-T
7	TYR62	PHE1	5.4	Hidrofóbica	pi-pi en forma-T
FEL					
1	ASP197:OD1	PHE1:N	4.6	Electroestática	Atracción por carga
2	GLU233:OD1	PHE1:N	5.5	Electroestática	Atracción por carga
3	ASP300:OE1	PHE1:N	5.1	Electroestática	Atracción por carga
4	THR163:HG1	GLU2:O	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
5	HIS305:HE1	GLU2:OE1	2.7	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
6	TYR62	PHE1:N	4.9	Electroestática	pi-cación
7	TRP59	GLU2:OE1	3.8	Electroestática	pi-anión
8	TRP59	GLU2:OE2	4.3	Electroestática	pi-anión
9	LEU162	PHE1	5.4	Hidrofóbica	pi-alquilo
10	ILE235	PHE1	5.4	Hidrofóbica	pi-alquilo
FIE					
1	GLU233:OE2	PHE1:HT2	1.8	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
2	LYS200:NZ	GLU2:OXT	5.2	Electroestática	Atracción por carga
3	ASP197:OD1	PHE1:N	4.5	Electroestática	Atracción por carga
4	ASP300:OD2	PHE1:N	5.2	Electroestática	Atracción por carga
5	TYR151	GLU3:OXT	4.2	Electroestática	pi-anión
6	LEU162	ILE2	4.6	Hidrofóbica	pi-alquilo
7	LYS200	ILE2	4.1	Hidrofóbica	pi-alquilo
8	LEU162	PHE1	5.1	Hidrofóbica	pi-alquilo
FKN					
1	ASP197:OD1	LYS2:HZ1	2.8	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
2	GLU233:OE1	LYS2:HZ1	3.0	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
3	ASP300:OD2	LYS2HZ2	2.5	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
4	ASP300:OD2	PHE1:N	4.7	Electroestática	Atracción por carga
5	TRP58:HE1	ASN3:O	3.0	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
6	HIS305:HD1	PHE1:O	2.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional

ANEXO 3. Continuación...

No.	Cadena A (α -amilasa)	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
FKN					
7	HIS305:O	PHE1:H1	2.7	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
8	ASP356:OD1	ASN3:HD22	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
9	ASP300:OD2	LYS2:HE2	3.0	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
10	TRP58	LYS2	5.0	Hidrofóbica	pi-alquilo
11	TRP59	LYS2	3.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
12	TRP59	LYS2	5.0	Hidrofóbica	pi-alquilo
FGKG					
1	GLU233:OE2	PHE1:HT1	2.2	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
2	ASP197:OD1	PH1:HT2	1.9	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
3	GLU233:OE2	PH1:HT2	2.2	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
4	TRP59:HE1	GLY4:O	2.5	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
5	ASP300:OD1	GLY2:HA2	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
6	ASP359:HE1	GLY4:HA2	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
7	TRP59	LYS	4.6	Electroestática	pi-cación
8	TRP59	GLY4:HN	3.0	Puente de hidrógeno	pi-hidrógeno
9	HIS305	LYS3:C,O;GLY4:N	3.9	Hidrofóbica	Amida-pi
10	TRP59	LYS3	4.5	Hidrofóbica	pi-alquilo
11	TRP59	LYS3	4.4	Hidrofóbica	pi-alquilo
12	LEU162	PHE1	4.8	Hidrofóbica	pi-alquilo
13	ALA198	PHE1	4.6	Hidrofóbica	pi-alquilo
MEE					
1	ARG195:NH1	GLU3:OXT	5.5	Electroestática	Atracción por carga
2	ARG195:NH1	GLU3:OE2	4.2	Electroestática	Atracción por carga
3	TRP59:HE1	GLU2:O	2.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
4	TRP59:HE1	GLU2:OE1	1.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional

ANEXO 3. Continuación...

No.	Cadena A (α-amilasa)	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
MEE					
5	HIS101:HE2	GLU2:OE1	3.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
6	TRP59	MET1:N	4.4	Electroestática	pi-cación
7	TRP59	MET1:HA	2.6	Hidrofóbica	pi-sigma
8	TRP58	MET1	5.4	Hidrofóbica	pi-alquilo
9	TRP58	MET1	5.1	Hidrofóbica	pi-alquilo
10	TRP59	MET1	5.2	Hidrofóbica	pi-alquilo
11	HIS305	MET1	5.2	Hidrofóbica	pi-alquilo

ANEXO 4. Relación de los aminoácidos involucrados en el acoplamiento molecular entre α -glucosidasa y los péptidos purificados.

No.	Cadena A (α -Glucosidasa)	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
FEI					
1	MET363:HN	PHE1	2.9	Puente de hidrógeno	pi-hidrógeno
2	TYR360	ILE3	4.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
3	ARG594	PHE1	5.2	Hidrofóbica	pi-alquilo
FEL					
1	GLU866:OE2	PHE1:N	5.5	Electroestática	Atracción por carga
2	GLU866:OE1	PHE1:N	5.5	Electroestática	Atracción por carga
3	GLU866:HA	GLU2:OE1	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
4	AARG594	PHE1	4.8	Hidrofóbica	pi-alquilo
FIE					
1	HIS584:NE2	PHE1:HT1	1.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
2	LEU868	ILE2	5.2	Hidrofóbica	pi-alquilo
3	HIS7178	ILE2	4.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
4	ARG608	PHE1	4.2	Hidrofóbica	pi-alquilo
FKN					
1	ARG608	ASN:OXT	1.9	Puente de hidrógeno; electroestática	Puente de sal; Atracción por carga
2	ALA604:O	LYS2:HZ2	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
3	TYR609	ASN3:HD22	1.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
4	LEU195:HA	LYS2:O	2.2	Puente de hidrógeno	Carbono-Hidrógeno
5	ALA604:O	LYS2:HEZ	2.9	Puente de hidrógeno	Carbono-Hidrógeno
6	LEU195	LYS2	4.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
7	LEU577	LYS2	4.7	Hidrofóbica	pi-alquilo
8	LEU565	PHE1	5.1	Hidrofóbica	pi-alquilo
FGKG					
1	ARG600:NH1	GLY4:OXT	5.5	Electroestática	Atracción por carga
2	ARG600:HH12	LYS3:O	1.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
3	ARG600:HH22	LYS3:O	2.7	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
4	PHE525:O	PHE1:HT2	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
5	ASP282:OD2	LYS3:HN	2.1	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
6	ASP518:OD2	GLY4:HA1	3.0	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
7	MET519:SD	LYS3:O	3.0	Otra	Sulfuro-X
8	ALA284	LYS3	5.2	Hidrofóbica	Alquilo

ANEXO 4. Continuación...

No.	Cadena A (α -Glucosidasa)	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
MEE					
1	ARG594:NH1	GLU3:OE1	5.0	Electroestática	Atracción por carga
2	ARG594:NH2	GLU3:OE2	4.0	Electroestática	Atracción por carga
3	VAR867:HN	GLU3:OE2	2.9	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
4	LEU868:HN	GLU3:OEXT	2.0	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
5	LEU868:HN	GLU3:OE2	2.0	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
6	HIS584	MET1:N	4.4	Electroestática	pi-cación
7	PHE362	MET1:SD	5.8	Otro	pi-sulfuro
8	HIS584	MET1:SD	4.2	Otro	pi-sulfuro
9	ARG608	MET1	5.3	Hidrofóbica	Alquilo

ANEXO 5. Relación de los aminoácidos involucrados en el acoplamiento molecular entre DPP4 y los péptidos purificados.

No.	Cadena A DPP4	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
FEI					
1	ARG560:NH2	GLU2:OE	1.0	Electroestática	Atracción por carga
2	TYR752:HH	PHE1:O	2.6	Puente de hidrógeno	pi-Hidrógeno
3	TYR752:OH	PHE1:HT1	3.8	Puente de hidrógeno	pi-Hidrógeno
4	TRP629	PHE1	4.9	Hidrofóbica	pi-sigma
5	TRP629	PHE1	4.7	Hidrofóbica	pi-sigma
6	TRP629	ILE3	4.7	Hidrofóbica	pi-alquilo
7	HIS740	ILE3	4.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
8	VAL653	PHE1	5.3	Hidrofóbica	pi-alquilo
FEL					
1	ARG126:HH22	GLU2:OE2	1.9	Puente de hidrógeno, Electroestática	Puente de sal, atracción por carga
2	GLU205:OE2	PHE1:HT1	1.9	Puente de hidrógeno, Electroestática	Puente de sal, atracción por carga
3	ARG125:NH1	GLU2:OE1	5.2	Electroestática	Atracción por carga
4	GLY741:HA1	GLU2:O	2.3	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
5	GLY741:O	LEU3:HA	2.7	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
6	TRP629	LEU3:HN	2.8	Hidrofóbica	pi-hidrógeno
7	ARG125:HB1	PHE1	2.6	Hidrofóbica	pi-sigma
8	VAL653	LEU3	4.7	Hidrofóbica	Alquilo
9	TRP629	LEU3	5.0	Hidrofóbica	pi-alquilo
FIE					
1	ARG125:NH1	GLU3:OE1	4.5	Electroestática	Atracción por carga
2	ARG125:NH2	GLU3:OE2	5.1	Electroestática	Atracción por carga
3	TYR752:OH	PHE1:HT1	1.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno
4	TYR547	GLU3:OXT	4.2	Electroestática	pi-anión
5	TYR547	GLU3:CA	3.5	Hidrofóbica	pi-sigma
6	TRP629	PHE1	3.9	Hidrofóbica	Apilamiento pi-pi
7	TRP629	PHE1	5.0	Hidrofóbica	Apilamiento pi-pi
8	TRP629	PHE1	5.8	Hidrofóbica	Apilamiento pi-pi
9	LYS554	ILE2	4.8	Hidrofóbica	Alquilo
10	VAL653	PHE1	4.8	Hidrofóbica	pi-orbital
FKN					
1	GLU452:HA	ASN3:OXT	2.9	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
2	ARG453:HA	ASN3:OD1	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
3	PRO510:O	PHE1:HA	2.4	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
4	GLU452:O	ASN3:HA	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
5	LYS512	PHE1	4.3	Hidrofóbica	pi-alquilo
6	ILE529	PHE1	5.0	Hidrofóbica	pi-alquilo
FGKG					
1	ASP709:OD1	LYS3:HZ1	1.9	Puente de hidrógeno, Electroestática	Puente de sal, atracción por carga
2	ASP739:OD2	LYS3:HZ2	1.9	Puente de hidrógeno, Electroestática	Puente de sal, atracción por carga
3	ARG125:HE	LYS3:O	3.0	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
4	ASN710:HD21	GLY4:O	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional

ANEXO 5. Continuación...

No.	Cadena A DPP4	Cadena B (Péptido)	Distancia (Å)	Categoría	Tipo
FGKG					
5	HIS740:HD2	GLY2:O	2.6	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
6	GLU205:OE1	GLY4:HA1	2.4	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
7	TRP629	PHE1:N	4.5	Electroestática	pi-cación
8	TRP629	PHE1:HA	2.8	Hidrofóbica	pi-sigma
9	TRP629	PHE1:C;GLY2:N	4.5	Hidrofóbica	Apilamiento pi-amida
10	TRP629	PHE1:C;GLY2:N	3.8	Hidrofóbica	Apilamiento pi-amida
11	TRP629	GLY2:C,O;LYS3N	4.6	Hidrofóbica	Apilamiento pi-amida
12	ARG125	LYS3	4.3	Hidrofóbica	Alquilo
13	HIS740	LYS3	5.2	Hidrofóbica	pi-alquilo
14	ALA743	PHE1	4.9	Hidrofóbica	pi-alquilo
MEE					
1	ARG125:HH11	GLU2:O	2.3	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
2	TRP201:HE1	GLU3:OE2	1.9	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
3	ASP709:HN	GLU3:OE1	2.8	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
4	ANS710:HN	GLU3:OE1	2.6	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
5	SER630:O6	MET1:HT1	2.1	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
6	TYR547:OH	MET1:HT2	19	Puente de hidrógeno	Puente de hidrógeno convencional
7	ARG125:HD2	GLU2:O	2.1	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
8	SER630:HB1	MET1:O	3.0	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
9	HIS740:HD2	MET1:O	2.7	Puente de hidrógeno	Carbono-hidrógeno
10	TYR662	MET1	5.0	Hidrofóbica	pi-alquilo
11	TYR666	MET1	4.5	Hidrofóbica	pi-alquilo