



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO (H₂O₂) SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL, NIVELES DE
FITOQUÍMICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN GERMINADOS
DE GARBANZO BLANCO**

TESIS

Que presenta:

LN. YUDITH ESCOBAR ZUÑIGA

Para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores:

Dr. Jorge Milán Carrillo

Dra. Liliana León López

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Posgrado en ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. Jorge Milán Carrillo y la Dra. Liliana León López, además de contar con la asesoría del Dr. Francisco Delgado Vargas. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación, Universidad Autónoma de Sinaloa; PROFAPI/UAS-2015/138 (Responsable técnico Dra. Liliana León López). L.N. Yudith Escobar Zuñiga recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Sinaloa, el día 06 del mes julio del año 2020, el (la) que suscribe **Yudith Escobar Zúñiga** alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 07054874, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Jorge Milán Carrillo** y la **Dra. Liliana León López** y cede los derechos del trabajo titulado **"Efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre el valor nutricional, niveles de fitoquímicos y capacidad antioxidante en germinados de garbanzo blanco"**, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Yudith Escobar Z.

Yudith Escobar Zúñiga

Nombre completo y firma

A mi madre

Por ser lo más importante de mi vida, mi razón para seguir adelante todos los días y mi motivación para superarme y ser mejor persona. Te amo mamá.

A mis hermanas

Que con sus consejos y su ejemplo me ayudan a ser cada día mejor. Éste logro se los dedico y espero se sientan muy orgullosas de mí. Las amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas y la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma de Sinaloa**, por formarme como profesionista, y a cada uno de los profesores que hicieron eso posible transmitiéndome sus conocimientos.

A mis directores de tesis, **Dr. Jorge Milán Carrillo y Dra. Liliana León López**, por aceptarme como su tesista, por su apoyo y confianza. En especial a la **Dra. Liliana** gracias por su paciencia, por aclarar siempre mis dudas, por transmitirme sus conocimientos y por brindarme su amistad, le tengo un especial afecto.

A mi asesor, **Dr. Francisco Delgado Vargas**, por el tiempo dedicado a hacerme sus acertadas observaciones y sugerencias con la finalidad de ayudarme a mejorar este trabajo, muchas gracias.

A la **Dra. Evangelina García, Dra. Yareli Salazar, M.C. Fernanda Quintero y Dra. Edith Cuevas**, gracias por compartirme sus conocimientos y por su tiempo invertido ayudándome en la realización de este proyecto.

A mis **compañeros de la maestría**, muchas gracias a todos por tantos momentos compartidos, todos son personas increíbles y de cada uno aprendí cosas que sin duda me ayudarán a ser mejor en todo lo que haga de ahora en adelante. Quiero agradecer a además a quienes me permitieron convivir con ellos de una forma aún más cercana, **Maribel y Aliette**, gracias por ser tan buenas amigas, por escuchar mis alegrías y tristezas, por aconsejarme y echarme porras cuando lo necesito, son increíbles personas que deseo tener siempre cerca, gracias por todo su apoyo desde el primer día, las quiero mucho. A **Cynthia y Demis**, gracias por su

bonita amistad, y tantos momentos compartidos, son parte importante de mi vida, los quiero mucho. Y un especial agradecimiento a **Jordi** por todo el tiempo invertido en compartir conmigo sus conocimientos, por apoyarme desde el primer día, por parecer mi asesor de tesis con tantas cosas que me ayudó a resolver, por su paciencia y amistad, muchas gracias amigo te quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio **Oscar, Masiel, Eslim, Astrid, Joselyn y Eduardo**, gracias por su ayuda siempre que lo necesité y por hacer muy divertidos mis días en el laboratorio.

A **Rosario Burboa**, muchísimas gracias por ser la mejor compañera de laboratorio, por ayudarme diariamente a desarrollar mi trabajo, por dedicar muchas horas de tu día para sacar a delante cada técnica que no quería salir, espero haber podido aportar cosas buenas en tu formación académica, así como tú lo hiciste a la mía, gracias también por brindarme tu amistad, sabes que te aprecio mucho.

A mi persona favorita, **Agustin López**, gracias por ser parte de cada etapa importante de mi vida desde hace ya 9 años, por preocuparte siempre por mí y por ayudarme a superarme cada día, por apoyarme siempre en las decisiones importantes, y por ser siempre el que me motiva para seguir creciendo y haciendo las cosas lo mejor posible, este nuevo logro también es gracias a ti. Te quiero.

Por último quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida, a mi familia, mi madre: **Rebeca Zuñiga** y hermanas: **Beatriz, Rebeca y Fabiola**, mil gracias por cuidarme siempre, por su amor y apoyo en todo lo que hago, por ser mi ejemplo a seguir y por no dejarme sola. Este logro se lo debo más que nada a ustedes. Las amo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
I. RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
A. GARBANZO (<i>Cicer arietinum</i> L.) BLANCO.....	7
1. Composición química	9
a. Compuestos fenólicos	11
1) Flavonoides.....	13
2) Isoflavonas	15
2. Formas de consumo del garbanzo en el mundo.....	22
3. Características del garbanzo blanco germinado	24
B. GERMINACIÓN	24
1. Factores que influyen en el proceso de germinación.....	27
a. Factores intrínsecos	27
b. Factores extrínsecos	29
C. ELICITORES.....	30
D. H ₂ O ₂ COMO INDUCTOR DE LA GERMINACIÓN	32
IV. JUSTIFICACIÓN.....	37
V. HIPÓTESIS	39
VI. OBJETIVOS.....	40
A. OBJETIVO GENERAL	40
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
A. MATERIALES:	41
B. MÉTODOS.....	41
1. Proceso de germinación	41
2. Comportamiento germinativo.....	42
3. Parámetros morfométricos	43
a. Adquisición de imágenes.....	43
b. Análisis morfométrico	44
4. Obtención de harinas.....	44
5. Obtención de extractos	44
6. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	45
7. Determinación de flavonoides totales	45
8. Determinación de la capacidad antioxidante	46
9. Optimización de condiciones de germinación.....	47
10. Composición química	50
a. Proteína cruda.....	50
b. Grasa cruda.....	51
c. Cenizas	51
d. Humedad.....	52
e. Carbohidratos totales	52
11. Digestibilidad de proteína in vitro	52
12. Perfil de isoflavonas	53
a. Separación e identificación.....	53
b. Cuantificación.....	54
13. Análisis estadístico	54

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
A. COMPORTAMIENTO GERMINATIVO	55
1. Porcentaje de germinación	55
2. Índice de germinación.....	58
B. MORFOMETRÍA DE RAÍZ Y PLÚMULA.....	58
1. Longitud y diámetro	58
C. MODELOS DE PREDICCIÓN PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂ Y TIEMPO DE GERMINACIÓN	62
1. Compuestos fenólicos totales.....	64
2. Flavonoides totales.....	68
3. Capacidad antioxidante	69
D. OPTIMIZACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂ Y TIEMPO DE GERMINACIÓN	73
A. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H ₂ O ₂ EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS GERMINADOS	73
B. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H ₂ O ₂ EN EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE 77	
C. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H ₂ O ₂ EN EL PERFIL DE ISOFLAVONAS	80
IX. CONCLUSIONES	89
X. BIBLIOGRAFÍA	90
ABREVIATURAS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Garbanzo Blanco Sinaloa-92	8
2	Estructura básica	14
3	Estructuras básicas de subclases de flavonoides	16
4	Actividades biológicas de los flavonoides en la salud humana y en la agricultura	17
5	Comparación de estructuras químicas del estradiol y equol	18
6	Síntesis de isoflavonas en leguminosas	19
7	Estructura, $UV_{máx}$ y pesos moleculares de isoflavonas presentes en garbanzo	21
8	Fases de la germinación	26
9	Germinación y crecimiento de garbanzo	28
10	Producción de peróxido endógeno	33
11	Esquema que muestra la relación entre peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido sulfhídrico (H_2S) y las interacciones asociadas con las fitohormonas para el control de la germinación de las semillas	35
12	Gráficas de superficie de respuesta y de contorno mostrando el efecto de las variables de proceso, sobre el contenido de fenólicos totales de las harinas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 .	67
13	Gráficas de superficie de respuesta y de contorno mostrando el efecto de las variables de proceso, sobre el contenido de flavonoides totales de las harinas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 .	70
14	Gráficas de superficie de respuesta y de contorno mostrando el efecto de las variables de proceso, sobre capacidad antioxidante de las harinas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 .	72
15	Gráfico de optimización para las variables de respuesta CFT, FT y CaOx	74
16	Cromatogramas de UPLC de las principales isoflavonas de extractos de garbanzo blanco Sinaloa-92	81
17	Contenido de isoflavonas totales en garbanzo	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Composición química de granos de garbanzo tipo Kabuli	10
2	Clasificación de los compuestos fenólicos	12
3	Formas de consumo del garbanzo en el mundo	23
4	Clasificación de los elicitores	31
5	Diseño experimental central compuesto rotatable	48
6	Combinaciones de concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tiempo de germinación (tG) para la obtención de germinados de garbanzo.	49
7	Porcentaje de germinación de garbanzo blanco Sinaloa-92 en semillas tratadas con H_2O_2	56
8	Índice de germinación de garbanzo blanco Sinaloa-92 en semillas tratadas con H_2O_2	59
9	Efecto del pretratamiento con H_2O_2 en la longitud y diámetro de raíz y plúmula	60
10	Diseño experimental y valores experimentales obtenidos.	63
11	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción	65
12	Valores predichos por los modelos y experimentales obtenidos en condiciones óptimas	75
13	Efecto del pretratamiento con H_2O_2 sobre el contenido de macronutrientes	76
14	Efecto del pretratamiento con H_2O_2 sobre el contenido de compuestos fitoquímicos y capacidad antioxidante	78
15	Identificación tentativa de isoflavonas en extractos de garbanzo blanco sin germinar, germinado óptimo y control.	82

I. RESUMEN

En México la principal área productora de garbanzo blanco es el noroeste del país, que comprende los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur. En esta región se produce el grano de mejor calidad de México y del mundo. El garbanzo presenta buenas características nutrimentales y además, contiene compuestos que no son considerados nutrientes, pero cuyo consumo proporciona beneficios para la salud; por ejemplo, polifenoles con alta capacidad antioxidante e isoflavonas fitoestrogénicas moduladoras del metabolismo, entre otros. Una alternativa para diversificar consumo de garbanzo es la obtención de germinados o brotes. Diversas investigaciones han reportado que el tratamiento de semillas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) desempeña un papel clave en la interrupción de la latencia. Asimismo, se ha demostrado que el H_2O_2 actúa como señalizador para la activación del sistema antioxidante en la semilla, condición que persiste en las plántulas para compensar el daño oxidativo inducido por la exposición a iones. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de H_2O_2 en la etapa de imbibición sobre el comportamiento germinativo, valor nutricional y nutracéutico de germinados de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco Sinaloa-92. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) basada en un diseño central rotatable para determinar el tiempo de germinación (tG) óptimo y la concentración de $[H_2O_2]$ óptima para maximizar el contenido de fenólicos totales (CPT), flavonoides totales (FT) y capacidad antioxidante (CaOx) en germinados de garbanzo. Los resultados mostraron que el H_2O_2 induce efectos positivos en la germinación de la semilla de garbanzo. El índice de germinación (IG) de las semillas

de garbanzo, evaluado a las 72 h, fue superior en las semillas tratadas con H_2O_2 . Las condiciones óptimas fueron $tG=72$ h y $[\text{H}_2\text{O}_2]=30$ mM, obteniéndose los siguientes valores: $\text{CFT}= 128.26 \pm 10.77$ mg EAG/100 g, $\text{FT}= 27.81 \pm 1.73$ mg EC/100 g y $\text{CaOx}=2411.09 \pm 202.45$ μM ET/100 g. El tratamiento óptimo presentó un contenido de proteína de 18.7% y de lípidos de 7.73%, mayor a lo obtenido en las semillas sin germinar (15.88% y 6.72% respectivamente). Con respecto a las semillas de garbanzo sin germinar, la germinación indujo un incremento porcentual significativo en los tratamientos óptimo y control (germinado por 72 h sin exposición a H_2O_2) de CFT 281.70% y 302.57%, FT 266.12% y 264.21% y CaOx de 246.07% y 214.49%, respectivamente. En semilla sin germinar se identificó tentativamente la presencia de prunetina, biocanina A y soyasaponina βg II. En germinado control se logró identificar tentativamente la presencia de 10 compuestos, de los cuales, 9 son isoflavonas, mientras que en el germinado óptimo se identificaron 9 compuestos, de los cuales 8 son isoflavonas. La aplicación de H_2O_2 no modifica el perfil de isoflavonas en garbanzo germinado durante 72h, sin embargo, incrementa el contenido de isoflavonas totales en un 16.67%. Se demostró que la aplicación de H_2O_2 mejora la capacidad germinativa de las semillas de garbanzo. Germinar bajo condiciones óptimas permite incrementar la CaOx y el contenido de isoflavonas totales, permitiendo su posible utilización como fuente no convencional de estos compuestos.

ABSTRACT

In Mexico, the main producing area of white chickpea is the northwest of the country, which includes the states of Sinaloa, Sonora, and Baja California Sur. In this region, the best quality grain of Mexico and the world is produced. The chickpea has good nutritional characteristics and also contains compounds that are not considered nutrients, but whose consumption provides health benefits; for example, polyphenols with high antioxidant capacity and metabolic modulating phytoestrogenic isoflavones, among others. An alternative to diversify the forms of consumption of chickpea is to obtain sprouts. Several investigations have reported that seeds treated with hydrogen peroxide exhibit an interruption on the seed latency. Likewise, has been reported that H_2O_2 acts as a signal molecule involved in the activation of the seed antioxidant system, a condition that persists in the seedlings to compensate the oxidative damage induced by ions exposure. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of the application of hydrogen peroxide (H_2O_2) during the imbibition stage on the germination behavior, nutritional and nutraceutical value of white chickpea sprouts (*Cicer arietinum* L.) Sinaloa-92. The response surface methodology (RSM) based on a central composite rotatable design was performed to determine the optimal germination time and optimal H_2O_2 concentration maximize total phenolic content (CFT), total flavonoids (FT) and antioxidant capacity (CaOx) in germinated chickpea. Results showed that H_2O_2 induces positive effects on chickpea seed germination. The germination index (IG) of the chickpea seeds, evaluated at 72 h, was higher in the seeds treated with H_2O_2 . The optimal conditions were $tG = 72$ h and $[H_2O_2] = 30$ mM, obtaining the following values: $CFT = 128.26 \pm 10.77$ mg EAG /

100 g, FT = 27.81 ± 1.73 mg EC / 100 g and CaOx = 2411.09 ± 202.45 μ M ET / 100 g. The optimal treatment showed a protein content of 18.7% and a lipid content of 7.73%, higher than that obtained in the non-germinated seeds (15.88% and 6.72% respectively). Compared to non-germinated chickpea seeds, the germination process induced a significant percentual increase in the optimal and control (germinated during 72 h without exposure to H₂O₂) treatments; CFT: 281.70% and 302.57%, FT: 266.12% and 264.21% and CaOx: 246.07% and 214.49%, respectively. In non-germinated seeds, the presence of prunetine, biochanin A and soyasaponin β g II was tentatively identified. In seeds germinated under control treatment, the presence of 10 compounds was tentatively identified; 9 of them correspond to isoflavones. Although, in seeds germinated under the optimal treatment, 9 compounds were identified, and 8 of them correspond to isoflavones. The application of H₂O₂ does not modify the isoflavone profile in chickpea germinated during 72h. However, H₂O₂ increases the total isoflavone content by 16.67%. The improvement in the chickpea germination capacity by the effect of the application of H₂O₂ was demonstrated. Germinating under optimal conditions increases CaOx and total isoflavone content in chickpea, allowing its possible use as a non-conventional source of these compounds.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los malos hábitos alimenticios están estrechamente asociados con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas y son un grave problema en el mundo. En este sentido, una de las tendencias actuales es el consumo de productos naturales que contribuyan a prevenir o tratar estos problemas que aquejan a la sociedad. En la búsqueda de estos productos, nuestro grupo de trabajo ha optado por estudiar algunos cultivos de importancia en la región como lo es el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco Sinaloa-92, variedad producida principalmente en los estados del noroeste de México (Sinaloa, Sonora y Baja California Sur), siendo Sinaloa líder nacional en su producción (Ortega y col 2013).

A nivel mundial el garbanzo se consume principalmente como grano. En México las formas de consumo son diversas, incluyendo su forma fresca, secada al sol y como ingrediente de alimentos tradicionales (INIFAP 2004). Una alternativa para diversificar su consumo es la obtención de germinados o brotes. Los germinados de garbanzo presenta una gran cantidad de compuestos fitoquímicos como fenólicos, carotenoides e isoflavonas, cuyo consumo provee beneficios a la salud (antioxidante, anticancerígenos, entre otros). Estos compuestos son metabolitos secundarios generados por las plantas como mecanismo de defensa a condiciones de estrés biótico o abiótico. El estrés provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) es una de las causas del incremento de la síntesis de metabolitos secundarios. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie reactiva de oxígeno que se produce en la célula vegetal de una manera altamente regulada. Esta molécula es un importante mensajero de señalización y desempeña un papel clave en una amplia gama de

procesos fisiológicos, tales como el crecimiento y el desarrollo celular, así como la adaptación a los cambios ambientales. Diversas investigaciones han reportado el papel del peróxido de hidrógeno como tratamiento durante la germinación, indicando que el H_2O_2 activa la germinación, el crecimiento activo del embrión y el sistema antioxidante en la semilla, que persiste durante su desarrollo a plántulas y que compensa el daño oxidativo inducido por iones (Swieca y Baraniak 2013; Mendoza-Sánchez y col 2016; Hasna y col 2017). Por tal motivo, la presente investigación evaluará el efecto del pretratamiento de semilla de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco Sinaloa-92 con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre el comportamiento germinativo, parámetros morfológicos y en la mejora de la calidad del germinado, evaluado como el incremento en compuestos bioactivos (compuestos fenólicos e isoflavonas), así como, su capacidad antioxidante. En un futuro, la información generada en este estudio contribuirá al conocimiento de las condiciones de pretratamiento con H_2O_2 y tiempo de germinación que permitan obtener germinados de garbanzo blanco con propiedades funcionales incrementadas que podrían ser consumidos directamente o emplearse como ingredientes funcionales en el desarrollo de nuevos alimentos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) BLANCO

El garbanzo pertenece a la familia de las leguminosas, de la tribu *Vicieae* y del género *Cicer*. Su origen de cultivo y consumo se encuentra en la zona de extremo oriente entre Turquía y Siria hace unos diez mil años. Existen dos tipos de cultivares: Desi y Kabuli. El garbanzo que es cultivado pertenece a la especie *C. arietinum* y la variedad que se cultiva en el Noroeste de México es la variedad *macrocarpum*, conocidos como blancos, pertenecientes al tipo Kabuli. Este último es una planta arbustiva, anual, de entre 40 y 65 cm de altura, de flores blancas, frutos en vaina bivalva que mide aproximadamente 1 cm de ancho y de 2.5 a 3.0 cm de largo, con una o dos semillas en su interior con un peso aproximado de 0.2-0.6 g cada una. Las formas más conocidas de las semillas de garbanzo blanco son la esférica y la alargada triangular (INIFAP 2004; Jukanti y col 2012; SIAP 2017) (**Figura 1**).

En México la principal área productora de garbanzo blanco es el noroeste del país, que comprende los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, en esta región se produce el grano de mejor calidad de México y del mundo, esto se debe al desarrollo de variedades que presentan características apreciadas por el mercado internacional (Gran tamaño o calibre del grano) (Ortega y col 2013). El garbanzo blanco Sinaloa-92 es un grano de gran aceptación en el mercado de la exportación, esta variedad ha llegado a ser reconocida en el mundo como el garbanzo “tipo mexicano” (INIFAP 2017).



Figura 1: Garbanzo Blanco Sinaloa-92

1. Composición química

El grano de garbanzo presenta un alto contenido de proteína (17-25 %). Se considera un alimento de alto valor energético, pues su contenido de carbohidratos totales oscila entre el 55-67 % y de estos, de 3-6 % corresponden a fibra dietaria. Contiene del 4-6 % de lípidos y 2-3 % de cenizas. (INIFAP 2004; Jukanti y col 2012; Fares y Menga 2014; Rachwa-Rosiak y col 2015)(**Cuadro 1**).

La concentración de aminoácidos esenciales de garbanzo blanco es superior a la recomendada para la dieta de un infante de 2 a 5 años, excepto los azufrados (metionina y cisteína). Los lípidos mayoritarios en garbanzo son ácidos grasos de cadena larga, entre los cuales sobresalen el ácido linoleico y oleico. También se han encontrado altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (20 a 36 %) y baja concentración de ácidos grasos saturados (10 a 23 %). El garbanzo tiene una concentración importante de calcio, fósforo, magnesio, hierro y potasio; así como niveles de fibra dietaria adecuados para ser considerado un alimento con efecto hipocolesterolémico (Jukanti y col 2012; Rachwa-Rosiak y col 2015).

Además de los nutrientes antes mencionados, el garbanzo contiene algunos compuestos que exhiben distintas actividades biológicas tales como prebiótica (oligosacáridos), hipoglucémica y quelante (fitatos), antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiulcerativa (esteroles) y antitumoral (esteroles y lectinas), destacando la presencia de compuestos con capacidad antioxidante (compuestos fenólicos) y fitoestrogénica, de control metabólico (isoflavonas) (Jukanti y col 2012; Aguilar-

Cuadro 1. Composición química de granos de garbanzo tipo Kabuli.

Componente	Porcentaje (%)
Proteína	17-25
Lípidos	4-6
Cenizas	2-3
Carbohidratos	55-67
Fibra dietaria	3-6

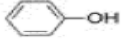
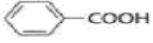
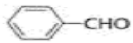
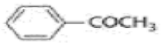
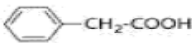
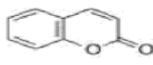
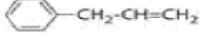
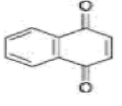
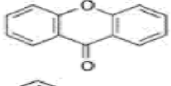
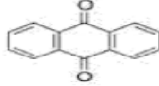
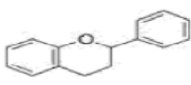
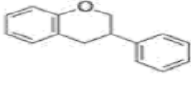
INIFAP (2004); Jukanti y col (2012); Fares y Menga (2014); Rachwa-Rosiak y col (2015).

Raymundo y Véles-Ruiz 2013; González-Cruz 2014; Rachwa-Rosiak y col 2015, Gupta y col 2017).

a. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas caracterizados por poseer uno o más anillos bencénicos con uno o más grupos hidroxilo. Por lo tanto, los alimentos a base de productos vegetales son una fuente de fenólicos. Diversos estudios han mostrado que el consumo de fenólicos induce efectos benéficos en la salud. Se ha identificado al menos 20 clases diferentes de compuestos fenólicos: fenólicos simples, ácidos fenólicos, fenólicos aldehídos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, coumarinas, fenilpropanos, flavonoides, biflavonoides, catecol-melaninas, naftoquinonas, estilbenos, xantonas, antraquinonas, benzoquinonas, cromonas, ligninas, lignanos, taninos. Existen diferentes formas de clasificar los compuestos fenólicos, de las cuales podemos resaltar las siguientes cuatro: en flavonoides y no flavonoides, por el número de anillos aromáticos, dependiendo de la organización de los átomos de carbono en la molécula (esqueleto de carbono) y por su estructura química básica (**Cuadro 2**). En plantas, los fenólicos son esenciales en el crecimiento, reproducción, e impartición de color; así como en mecanismos de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores. La actividad antioxidante se ha considerado como la función biológica más importante de los fenólicos. Los antioxidantes son sustancias químicas presentes en bajas concentraciones, en comparación con los metabolitos primarios (e.g. proteínas, lípidos e hidratos de carbono), que retrasan o previenen la

Cuadro 2. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Número de anillos aromáticos	Esqueleto de carbono	Nombre del grupo	Estructura química básica
Uno	C_6	Fenólicos simples	
		Benzoquinonas	
	C_6-C_1	Ácidos fenólicos	
		Fenólicos aldehídos	
	C_6-C_2	Acetofenonas	
		Ácidos fenilacéticos	
	C_6-C_3	Ácidos hidroxicinámicos	
		Coumarinas	
		Fenilpropanos	
		Cromonas	
Dos	C_6-C_4	Naftoquinonas	
		Xantonas	
	$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	
		Antraquinonas	
	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides	
		Isoflavonoides	
		Neoflavonoides	
		Lignan	
		Neolignan	
		Catecol melaninas	
Tres o más	$(C_6-C_3)_2$	Ligninas	Múltiple
	$(C_6)_n$		Múltiple
	$(C_6-C_3)_n$		Múltiple
	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoides	Múltiple
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados (proantocianidinas)	Múltiple

Nollet y Gutiérrez-Urbe (2018)

oxidación de sustratos. Los fenólicos pueden actuar tanto por transferencia de electrones como de átomos de hidrógeno, esto contribuye a eliminar a radicales altamente reactivos, mientras que el compuesto fenólico se convierte en un radical estabilizado por el anillo bencénico, cuya energía puede ser relajada por mecanismos que no implican daño para el organismo; debemos recordar que los radicales libres pueden dañar a biomoléculas (e.g. lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) afectando negativamente el metabolismo celular y del organismo. En este sentido, los compuestos fenólicos poseen propiedades antimutagénicas, anticancerígenas y antiglicémicas y potencialmente pueden ser dirigidos a la prevención de enfermedades crónicas mediante el diseño y desarrollo de alimentos e ingredientes alimentarios que promuevan la salud (Cheynier 2012; Sarkar y Shetty 2014; Nollet y Gutierrez-Urbe 2018).

1) Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de más de 5000 compuestos fenólicos de gran presencia en el reino vegetal; junto con la clorofila y los carotenoides, los flavonoides son los encargados de la pigmentación en las plantas. Estructuralmente, estos compuestos se caracterizan por tener un esqueleto básico fenilbenzopirona (C6-C3-C6), el cual consta de dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos por tres carbonos formando un anillo central pirano oxigenado (anillo C). Dependiendo de la posición del anillo B, los flavonoides pueden clasificarse en tres grandes grupos: isoflavonoides (en la posición 3 del anillo C), neoflavonoides (en la posición 4 del anillo C), flavonoides (en la posición 2 del anillo C) (**Figura 2**). Los flavonoides a su vez, pueden subdividirse en subclases dependiendo las características del anillo

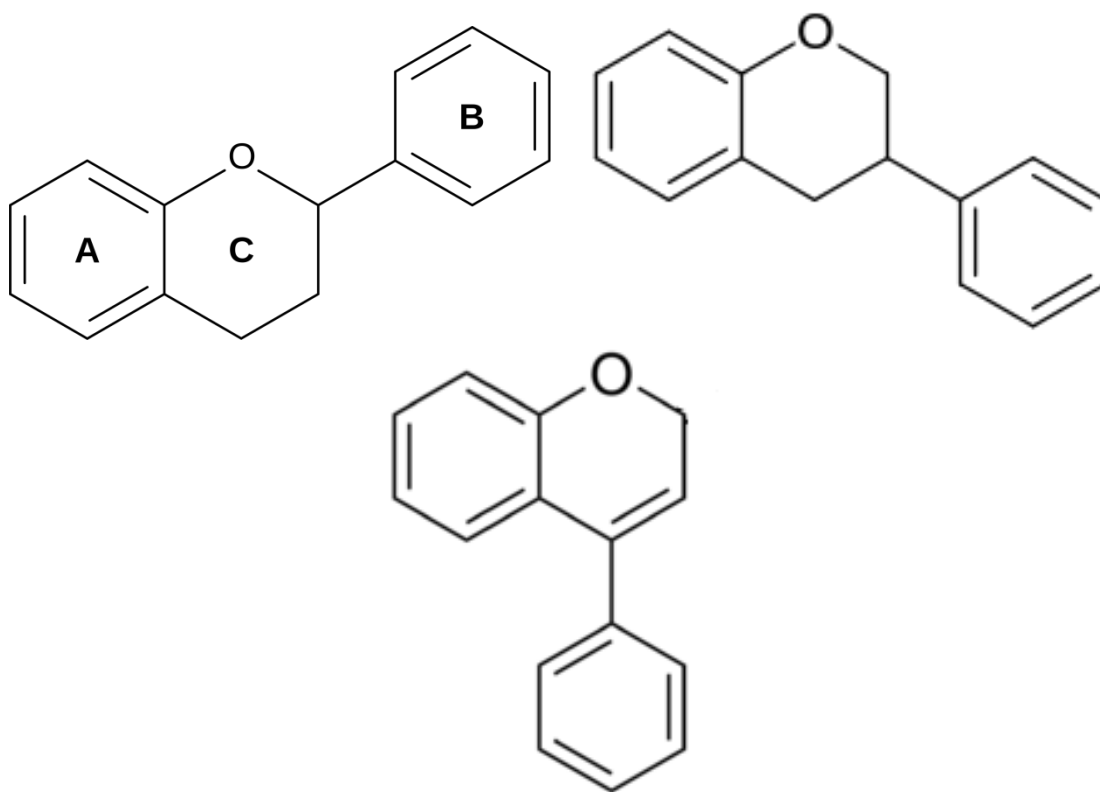


Figura 2. Estructura básica: a) flavonoide, b) isoflavonoide y c) neoflavonoide.

C en: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles o catequinas, antocianinas y chalconas (**Figura 3**). En las plantas, los flavonoides pueden estar presentes como agliconas o unidos a azúcares (e.g. glucósido, glucurónido, galactósido, arabinósido, ramnosido, apiosilglucósido y malonilo) mediante enlaces carbono-carbono o a través de un grupo OH (Wu-Yang y col 2009; Panche y col 2016; Nollet y Gutiérrez-Urbe 2018).

Los flavonoides juegan un papel de gran importancia para las planta debido a su acción como potentes antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atractores visuales (por generar color), entre otras funciones; por otra parte, diversos estudios han sugerido que estos compuestos presentan actividades biológicas y que el consumo de ellos podría traer grandes beneficios a la salud. Algunas de las acciones que presentan estos compuestos incluyen, capacidad antioxidante (Ren y col 2003), antidiabética (Ganugapti y col 2011), antimutagenica (Snijman y col 2007), contra enfermedades renales (Shoba y col 2010), antiinflamatoria (D'Mello y col 2011), y contra enfermedades neurodegenerativas (Sheng y col 2009), entre muchas otras (**Figura 4**).

2) Isoflavonas

Las isoflavonas son una clase de flavonoides con propiedades fitoestrogénicas debido a su similitud estructural con el estrógeno 17 β -estradiol (**Figura 5**). Las isoflavonas son sintetizadas por la vía central de los fenilpropanoides y posteriormente por las vías específicas de las ramificaciones de isoflavonoides en las leguminosas (**Figura 6**). La vía de los fenilpropanoides es común en todas las especies vegetales y mediante ella se producen ligninas, cumarinas y ácidos

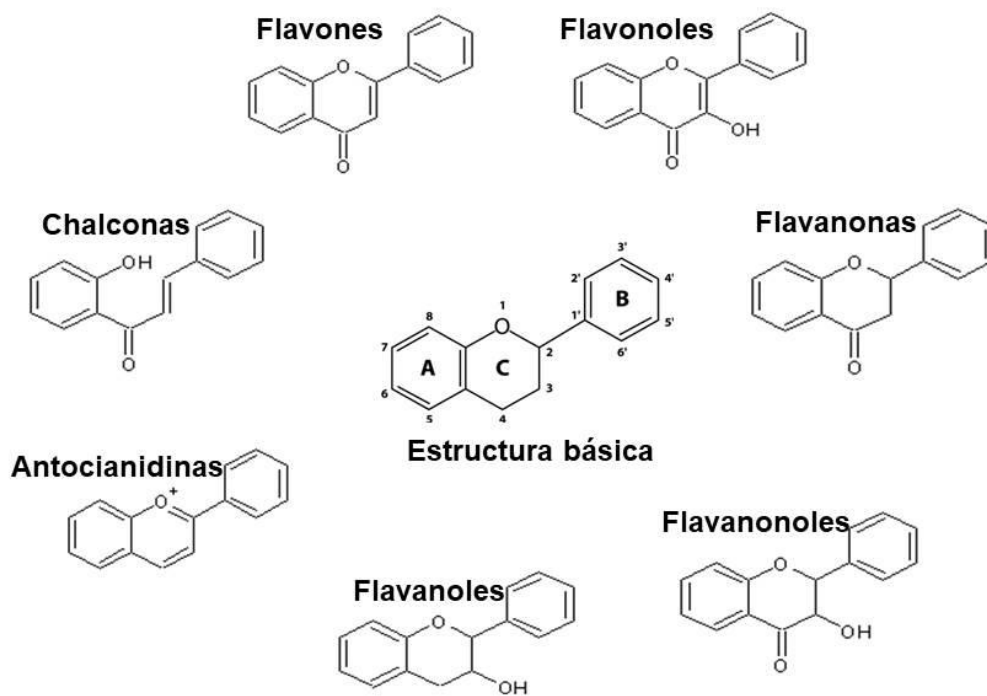


Figura 3. Estructuras básicas de subclases de flavonoides.

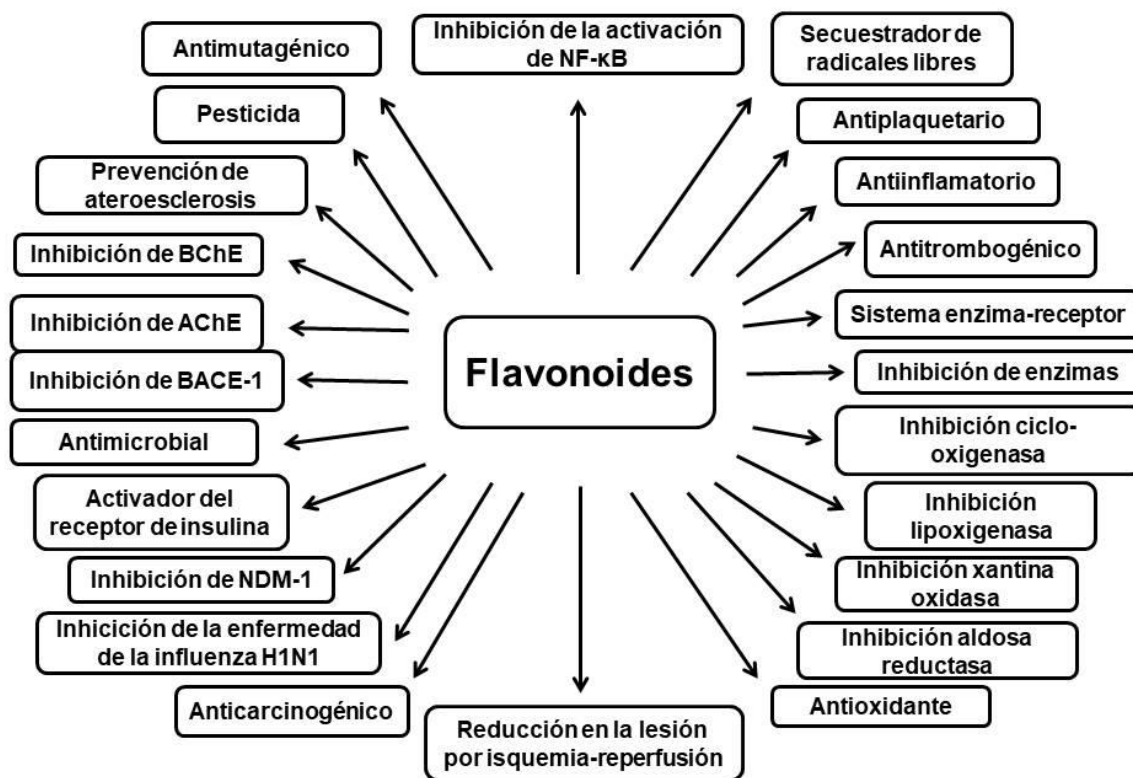


Figura 4. Actividades biológicas de los flavonoides en la salud humana y en la agricultura. BChE: butirilcolinesterasa; AChE: acetilcolinesterasa; BACE-1: enzima β secretasa-1; NDM-1: Nueva Delhi metalo- β -lactamasa-1; H1N1: hemaglutinina 1 neuraminidasa 1(Panche y col 2016).

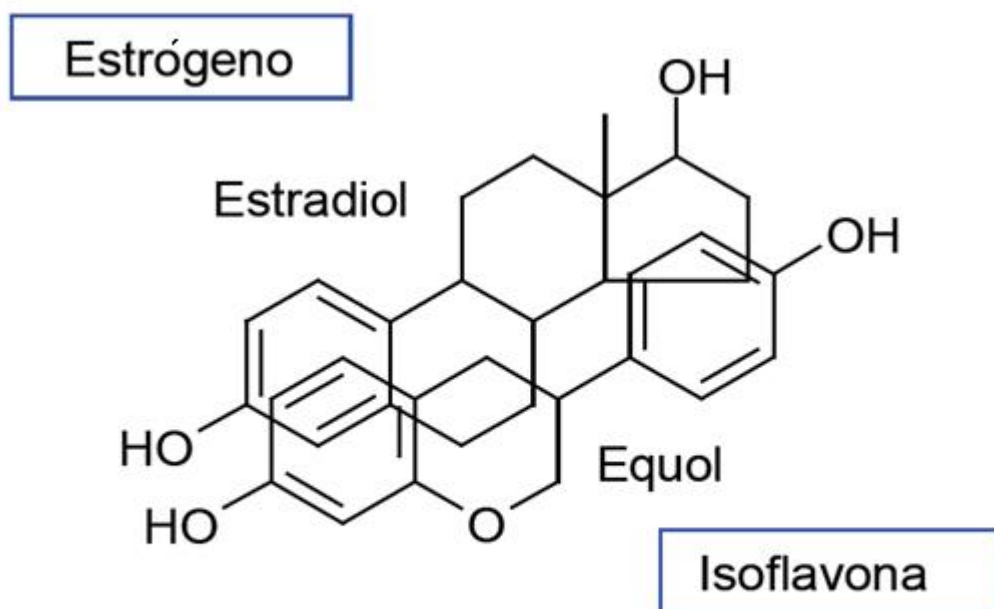


Figura 5. Comparación de estructuras químicas del estradiol y equol (Mendoza y col 2015).

benzoicos, estilbenos, y flavonoides/ isoflavonoides. El primer paso en la producción de flavonoides e isoflavonoides es la obtención de las chalconas, mediante la enzima chalcona sintasa y posteriormente este se dirige a la vía de los isoflavonoides con acción de la enzima de ramificación, 2-hidroxiisoflavanona sintasa (Wu y col 2012). Una de las principales enzimas involucradas en la vía central de los fenilpropanoides es la fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés), ésta cataliza la primera reacción y se activa en diferentes situaciones de estrés en las semillas como mecanismo de defensa, lo que trae como consecuencia un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos. En garbanzo, se ha estudiado la acción de esta enzima al someter las semillas a estrés con selenito de sodio durante la germinación, lo cual se tradujo en un aumento en el contenido de isoflavonas y la capacidad antioxidante en los germinados (Guardado-Félix y col 2017).

Las isoflavonas son componentes importantes de las semillas y germinados de garbanzo, entre los que se encuentran los siguientes 8 fitoestrógenos: biocanina A, formononetina, genisteína, 2'-hidroxibiocanina A, calicosina, daidzeina, isoformononetina y pseudobaptigenina (**Figura 7**). Estudios recientes mostrarán que el nivel de isoflavonas fue sustancialmente mayor en los germinados de garbanzo que en las semillas (Wu y col 2012; Ma y col 2013). Asimismo, se ha sugerido que las plantas incrementan su contenido de isoflavonas como respuesta a diferentes tipos de estrés (Ludueña y col 2007).

Se ha demostrado que las isoflavonas ejercer efectos benéficos a la salud, actuando como agentes estrogénicos, antiestrogénicos, antiaterogénicos, antioxidan-

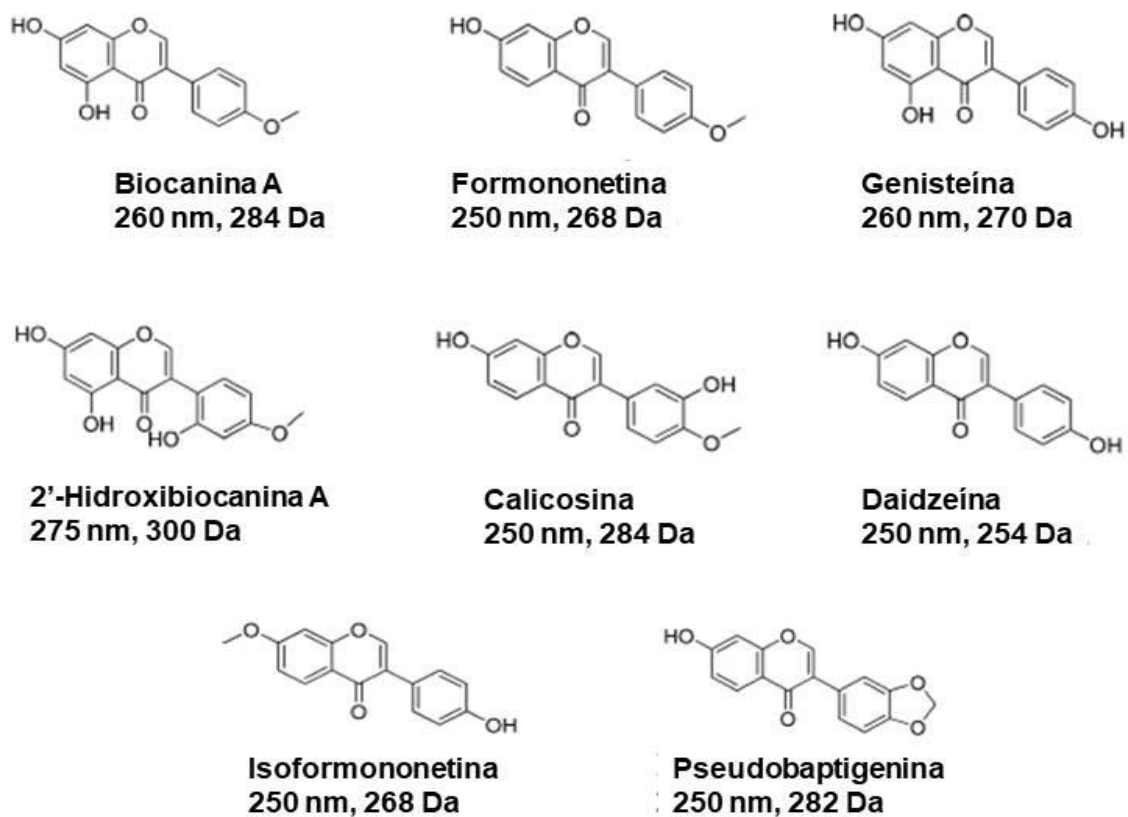


Figura 7: Estructura, $UV_{\text{máx}}$ y pesos moleculares de isoflavonas presentes en garbanzo (Wu y col 2012).

tes, antifúngicos y anticancerígenos (Hsieh y col 2004; Gikas y col 2008).

2. Formas de consumo del garbanzo en el mundo

El mayor consumo de garbanzo se encuentra principalmente en los trópicos semi-áridos. En los países donde la base de la alimentación es el garbanzo, este es primeramente procesado para su consumo. El remojo, descascarillado y secado son las principales formas de procesamiento, para posteriormente utilizarse como materia prima para la elaboración de distintos productos alimenticios. Existen otras formas de consumo del garbanzo como: cocido, tostado, frito, verdes, cocido mezclado con agua para la elaboración de salsas y aderezos y en menor medida germinado, entre otras (**Cuadro 3**) (INIFAP 2004).

En México, a pesar de ser uno de los principales países productores de este grano no es considerado parte de la alimentación típica de la región; el garbanzo cocido es la principal forma de consumo en México, siendo un ingrediente importante de un platillo típico llamado “cazuela”. Otra forma de consumo es el garbanzo verde inmaduro en forma de botana; el consumo del garbanzo en otras presentaciones, como germinado, no es tan popular en México a pesar de la existencia de un gran número de reportes científicos que muestran los posibles beneficios de sus consumo. (El-Adawy 2002; INIFAP 2004; Khattak y col 2007).

Diversas investigaciones han demostrado el efecto de las diferentes formas de procesamiento del garbanzo sobre el contenido nutrimental de esta leguminosa, reportando pérdidas significativas de sólidos solubles, principalmente vitaminas y minerales, aminoácidos como lisina, triptófano y en el contenido total de aminoácidos

Cuadro 3. Formas de consumo del garbanzo en el mundo.

País	Forma de consumo
India	Remojado y descascarillado (Dhal), germinado: fresco, cocido, seco, tostado y molido.
Sureste de Asia	Cocidos, hinchados, tostado, asado, harina.
Estados unidos de américa	Verdes: cocidos, tostados y pelados.
Afganistán	Grano seco, tostado con sal o azúcar.
Chile	Descascarillado en sopa o crema.
Etiopía	Verdes, cocidos, tostados, germinados.
Irán	Crudo, tostado, cocido, sopas.
México	Cocido, verdes.
Nepal	Crudo, tostado, cocido, atole, harinas.
Perú	Verde, grano seco, cocido, tostado.
España	Cocido.
Egipto	Cocido.
Siria, Líbano y Jordania	Tostado, sustituyendo al café en bebida.
Túnez	Cocido, sustituyendo al café en bebida.
Turquía	Bebidas.

(INIFAP 2004)

aromáticos, traduciendo en un decremento importante de la calidad nutricional al someterlo a procesos donde interviene las altas temperaturas, como la cocción, y se recomienda el uso de otras formas de procesamiento menos drásticas, como la germinación, que promueve la disminución de compuestos indeseables, además ayuda a incrementar el contenido de algunos compuestos de gran importancia (El-Adawy 2002; Fares y Menga 2014).

3. Características del garbanzo blanco germinado

La germinación del garbanzo, y de las semillas en general, implica diversos procesos metabólicos que modifican su composición. Algunos componentes aumentan, por ejemplo, vitaminas (principalmente del complejo B), β -carotenos (siendo la iluminación un factor importante para este incremento) y compuestos fenólicos. La biodisponibilidad de proteínas, minerales y ácido ascórbico también se incrementa. Por otro lado, el contenido de algunos compuestos indeseables disminuye, por ejemplo, ácido fítico y los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa, los cuales son agentes promotores de flatulencias. Asimismo, se ha establecido que la germinación favorece las propiedades sensoriales. También se ha señalado que la germinación puede disminuir el contenido de proteínas, sin embargo, si se varía el tipo de iluminación durante el proceso de germinación, tanto la concentración como su digestibilidad pueden incrementar (Khattak y col 2007; González-Cruz 2014).

B. GERMINACIÓN

La germinación es un proceso a través del cual se forma una nueva planta a partir de una semilla seca. Consiste en la reanudación de la actividad metabólica y

del crecimiento activo de los tejidos del embrión que resulta en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una plántula (Kermode 1990).

La germinación comienza en el momento que las semillas entran en contacto con el agua y se ha dividido en tres fases (Herrera y col 2006; Weitbrecht y col 2011) **(Figura 8)**:

1) fase de imbibición, en el cual las semillas absorben el agua necesaria para la rehidratación de proteínas, orgánulos celulares y para que ocurran reacciones hidrolíticas. La permeabilidad de la testa juega un papel importante en la tasa de absorción de agua, sin embargo debido a que las semillas secas tienen muy bajos potenciales de agua, causa una entrada rápida de agua lo que provoca un cambio drástico en el tamaño y forma, así como la salida masiva de solutos celulares. A pesar de que esta salida de solutos contribuye a la germinación al disminuir las concentraciones de inhibidores dentro de las semillas, esto también es un indicativo de daño en las membranas celulares causado por la rápida y/o no homogénea rehidratación, por lo cual durante esta fase las semillas activan una serie de mecanismos con la finalidad de reparar el los daños.

2) fase de activación metabólica, donde ocurre la degradación de reservas y síntesis de compuestos necesarios para que la germinación se produzca, pero sin que ocurra la emergencia de las radículas. En esta fase el contenido de agua permanece estable y su duración es muy variable y depende de cada especie, en algunas, abarca hasta la ruptura de la testa.

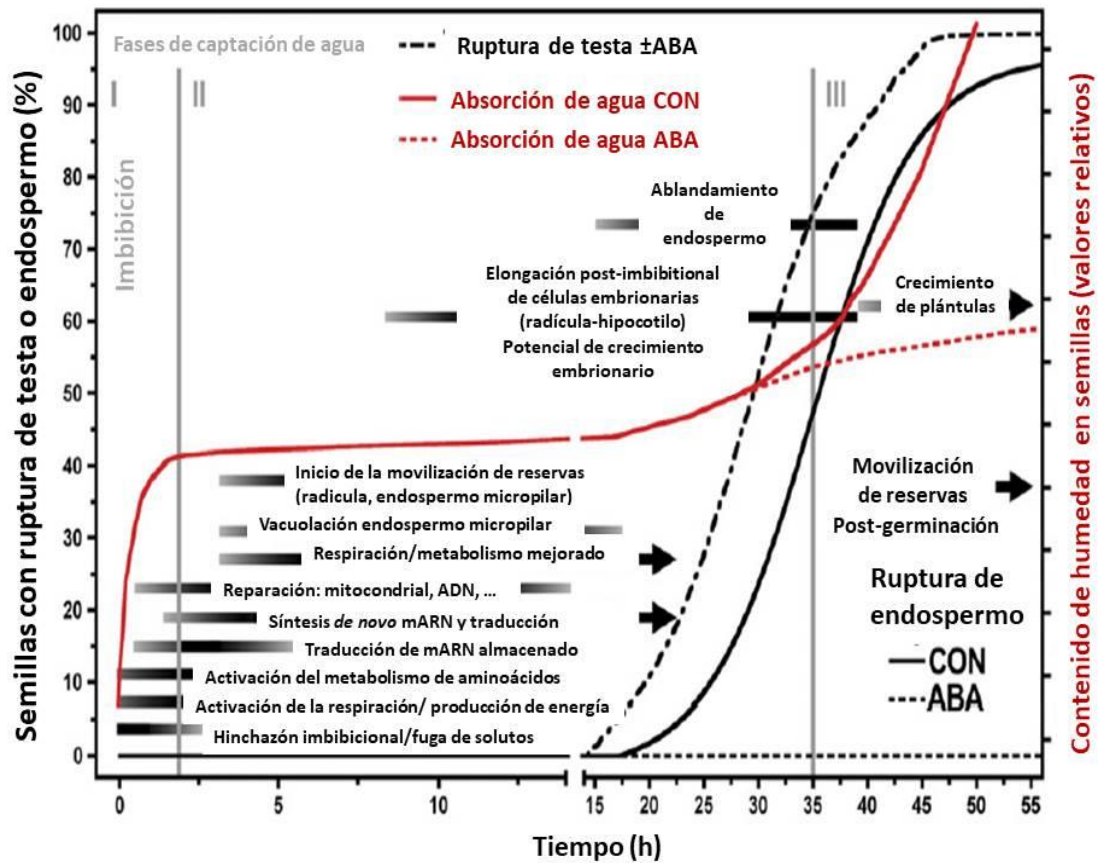


Figura 8. Fases de la germinación. Ejemplo del tiempo de la captación de agua en la semilla de *Arabidopsis thaliana*, la rotura de la testa, el endospermo y el efecto del ácido abscísico (ABA) en estos procesos; Control sin hormona añadida (CON) Weitbrecht y col 2011.

3) fase de crecimiento de la radícula, donde la radícula penetra las estructuras que envuelven la semilla, esto marca el fin de la germinación. La captación de agua en esta fase continúa durante la transición al crecimiento de la plántula.

En el caso de garbanzo, la fase 3 se lleva a cabo de forma criptohipógea, es decir, los cotiledones y la plúmula permanecen bajo tierra durante el proceso (**Figura 9**).

1. Factores que influyen en el proceso de germinación

Durante el proceso de germinación y crecimiento vegetal, existen diferentes factores que permiten el desarrollo del mismo, así como la obtención de materiales con un perfil de compuestos fitoquímicos mejorado. Estos factores se pueden dividir en intrínsecos (propios de la semilla) y extrínsecos (dependientes del ambiente) (Rosental y col 2016).

a. Factores intrínsecos

La germinación es afectada por diferentes factores intrínsecos relacionados con el metabolismo propio de la semilla, el cual cambia a lo largo de su maduración y durante el proceso de germinación. Una semilla es considerada madura cuando ésta ha alcanzado su completo desarrollo tanto morfológico como fisiológico, y además ha sido capaz de acumular las reservas necesarias para tener energía que permita que se lleve a cabo correctamente la germinación, sin embargo, en ocasiones a pesar de que la semilla sea madura y tenga buenas reservas energéticas, ésta no es capaz de germinar. Esto puede deberse a una acumulación de productos tóxicos para el embrión generados por un metabolismo menos activo, comprometiendo la viabilidad

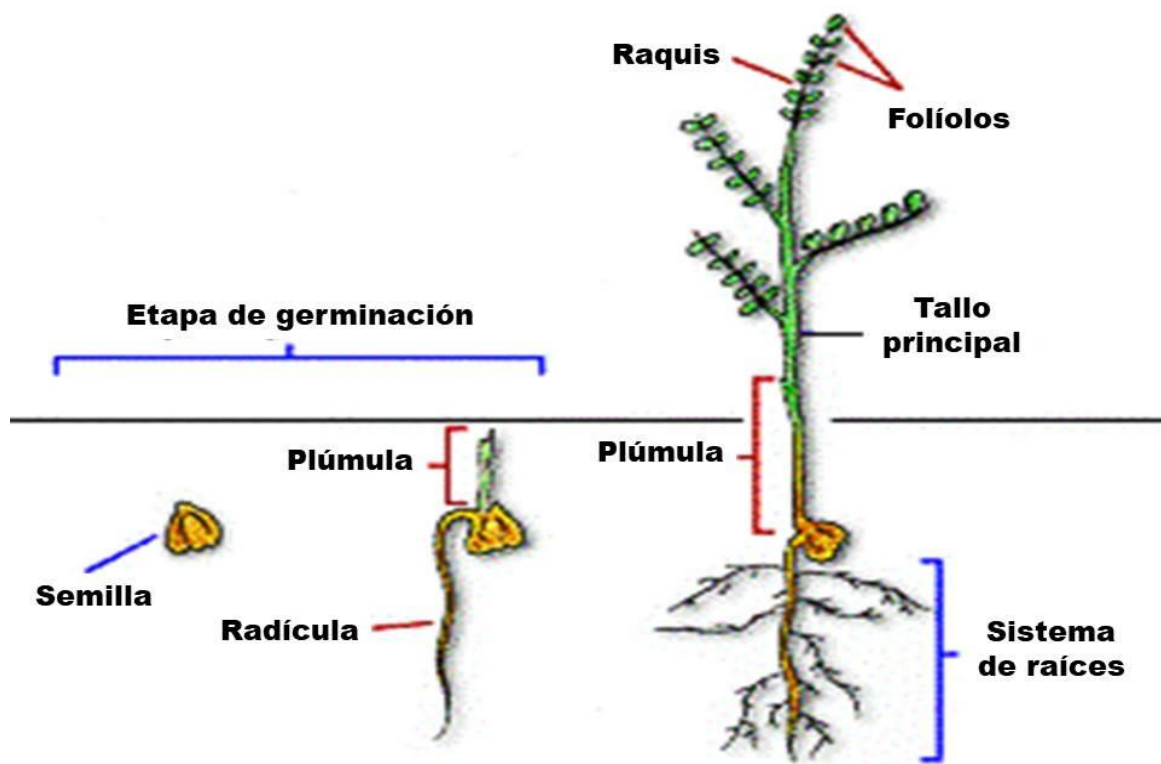


Figura 9. Germinación y crecimiento de garbanzo.

de la semilla y manteniéndola en un estado de latencia (Rosental y col 2016; Romero 2018).

b. Factores extrínsecos

La germinación depende también de factores ambientales (extrínsecos) tales como, la humedad, temperatura, luz y señales químicas (Baskin y Baskin 2014).

La disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes durante el proceso de germinación, debido a que ésta es necesaria para que se lleve a cabo la primera fase de la germinación (fase de imbibición), rehidratando la semilla, permitiendo que se lleven a cabo reacciones hidrolíticas, rompiendo la dormancia (Herrera y col 2006).

Una temperatura óptima durante la germinación permitirá que las reacciones enzimáticas propias del proceso, se lleve a cabo correctamente, permitiendo así, un correcto desarrollo del embrión. La temperatura óptima dependerá de cada especie (Doria 2010).

La presencia de luz durante la germinación, no es un factor indispensable, ya que el proceso puede llevarse a cabo aun permaneciendo la semilla en obscuridad, sin embargo, la presencia de ésta interviene en la síntesis de diversos compuestos (p. ej. clorofilas, carotenoides, etc.), que se encontrarían disminuidos en las plántulas al encontrarse en ausencia de luz (Khattak y col 2008).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), han sido consideradas solamente moléculas tóxicas para los organismos vivos, sin embargo, trabajos recientes han

demostrado que éstas también cumplen un papel como señalizadores químicos importantes en el proceso de germinación o la ruptura de la dormancia de las semillas. Se ha demostrado que EROs como el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico, se acumulan durante la germinación de las semillas en varias especies. Diversas investigaciones han informado que la aplicación exógena de H_2O_2 promueve la germinación, considerándolo así, un elicitor (Barba-Espín y col 2012).

C. ELICITORES

Los elicitores son sustancias exógenas que producen cambios fisiológicos en las plantas, las cuales, en respuesta a estos agentes estresores activan una serie de mecanismos, similares a la respuesta producida por el ataque de patógenos o estímulos ambientales, que trae como consecuencia un cambio en el metabolismo de la planta, mejorando la síntesis de compuestos fitoquímicos, en este sentido, se ha propuesto su utilización en la industria alimentaria como herramienta para mejorar las propiedades nutrimentales de productos para su consumo en fresco, o en la industria farmacéutica para la obtención de ingredientes o para aumentar los rendimientos en la extracción de compuestos nutraceuticos (Pérez-Balibrea y col 2011; Baenas y col 2014). Existen diferentes clasificaciones de los elicitores, como la propuesta por Baenas y col 2014 (**Cuadro 4**), quienes clasifican en base a su origen en: hormonas de plantas, bióticos y abióticos, los cuales a su vez se dividen en físicos y químicos. Dentro de los elicitores abióticos podemos clasificar como elicitores químicos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual, no se encuentra en la clasificación propuesta por este autor, pero cumple con las características para encontrarse en ella.

Cuadro 4. Clasificación de los elicitores.

Hormonas de plantas	
Ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno, giberelina, metil jasmonato, salicilato de metilo, citoquinina.	
Elicitores bióticos	
Lipopolisacárido	
Polisacáridos: pectina y celulosa, quitosano, quitina y glucanos (microorganismos), alginato, goma guar, goma arábica.	
Oligosacaridos: Galacturonides.	
Proteínas: Celulasa, glucoproteínas, proteína de pescado, hidrolizados, lactoferrina.	
Composición compleja: esporas de hongos, pared celular de micelios, pared celular microbiana.	
Toxinas patógenas: Coronatina.	
Extracto de orégano.	
Elicitores abióticos	
Químicos	Físicos
Ácido acético	Enfriamiento
Biorregulador prohexadiona	CO ₂
Etanol	Sequía
Ozono	Choque de temperatura extrema
Sales inorgánicas: Cloruro de mercurio (HgCl ₂), Sulfato cúprico (CuSO ₄) y Cloruro de calcio (CaCl ₂)	Altas presiones
Iones metálicos: Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Al ³⁺ , Ag ²⁺ , Ag ⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ and Cd ²⁺	Alta o baja osmolaridad
	Radiación UV
	Estrés salino

D. H_2O_2 COMO INDUCTOR DE LA GERMINACIÓN

El H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno (ERO) altamente tóxicas para las plantas, aunque éste se produce de manera normal durante varios procesos fisiológicos en la célula vegetal como, la respiración aeróbica y la fotosíntesis (**Figura 10**). Estas moléculas son importantes mensajeros de señalización que desempeñan un papel clave en el control de una amplia gama de procesos fisiológicos, tales como el crecimiento y el desarrollo celular, así como la adaptación a cambios ambientales. Dada la toxicidad del H_2O_2 y en general de las EROs, su producción debe regularse de forma estricta, esto mediante los sistemas de defensa de la planta, enzimático y no enzimático. El sistema enzimático incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión peroxidasa (GPX), guayacol peroxidasa (GOPX) y glutatión-S-transferasa, (GST). Mientras que el sistema no enzimático incluye al ácido ascórbico (ASH), glutatión (GSH), compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos no proteicos y α -tocoferoles. Estos dos sistemas antioxidantes trabajan en conjunto para controlar las cascadas de oxidación y evitar el daño al organismo (Gill y Tuteja 2010; Kärkönen y Kuchitsu 2015).

En la actualidad se ha implementado como estrategia el uso de diversos compuestos, entre ellos el H_2O_2 , en diversas especies vegetales, durante diferentes etapas del crecimiento de estas, para observar su efecto sobre algunas características agronómicas (% germinación, índice de crecimiento, etc.), capacidad

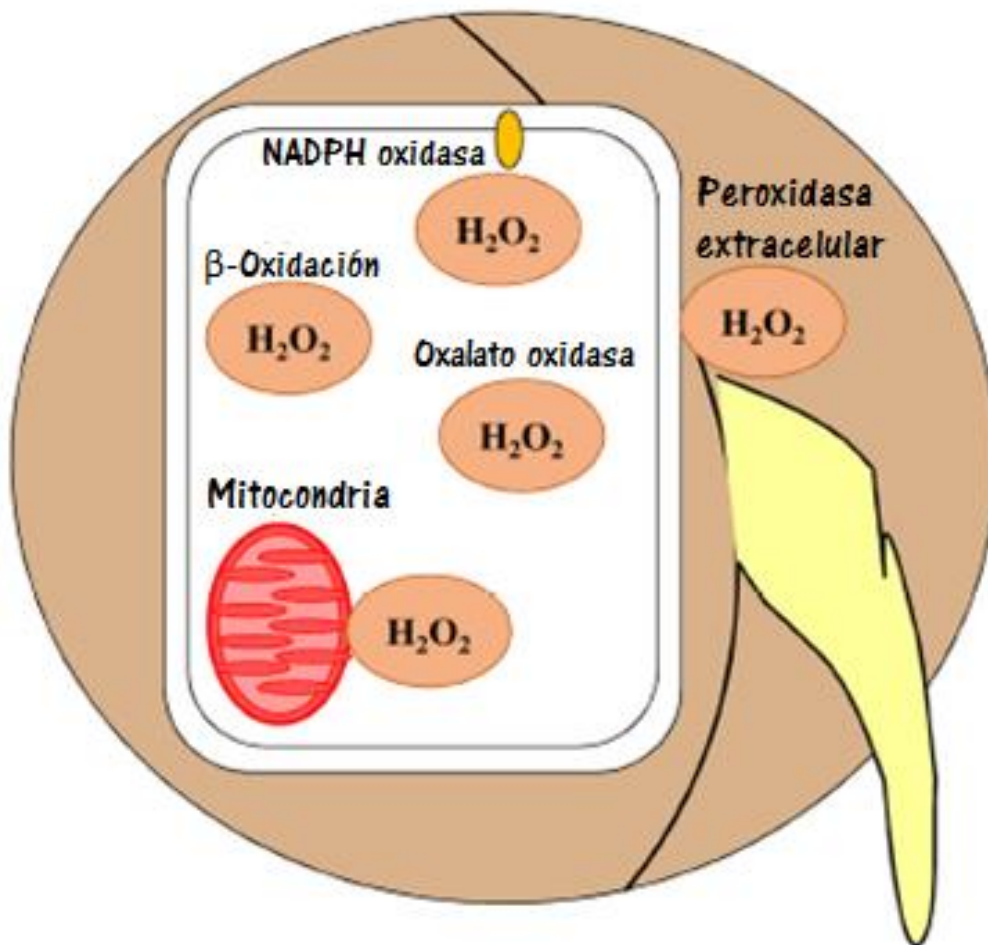


Figura 10: Producción de peróxido endógeno (Wojtyla y col 2015).

antioxidante enzimática, entre otras. Tal es el caso de Barba-Espín y col (2012) quienes estudiaron el papel del H_2O_2 en la germinación empleando como modelo la semilla de chícharo, registrando un incremento en la eficiencia de germinación, en el crecimiento de las plántulas, y revitalización de las semillas; asimismo, sugirieron que el H_2O_2 podría actuar como molécula de señalización en el inicio de la germinación.

El interés del estudio de la elicitación con H_2O_2 crece debido a investigaciones que han propuesto mecanismos de acción de éste, sobre diversas especies vegetales. Kyohei y col 2016 demostraron que el H_2O_2 endógeno producido por la NADPH oxidasa en semillas de cebada, regula los niveles de giberelina (GA) y ácido abscísico y por lo tanto la germinación. Asimismo, demostraron que la acumulación excesiva de EROs en la semilla causa daño oxidativo, lo que reduce la capacidad de germinación, pero a su vez, la insuficiencia de EROs la suprime.

En la **Figura 11** se puede observar el mecanismo propuesto por Wojtyla y col (2015) donde se explica, que tanto el óxido nítrico (NO) como el H_2O_2 , desempeñan una función paralela en términos de interrupción de la latencia y la promoción de la germinación, donde la acumulación de moléculas de señalización durante la imbibición influye en el equilibrio de las fitohormonas disminuyendo los niveles de ácido abscísico (ABA), citoquinina (CK) y auxina (IAA), mientras aumentan el ácido giberélico (GA) y el etileno (ET). Los efectos combinados de las moléculas de señalización y las fitohormonas, así como la transducción de señales a través de diferentes vías (SnRK2s, RACK1 y MAPK), conducen al control y regulación de las transiciones desde el estado de latencia hasta la germinación.

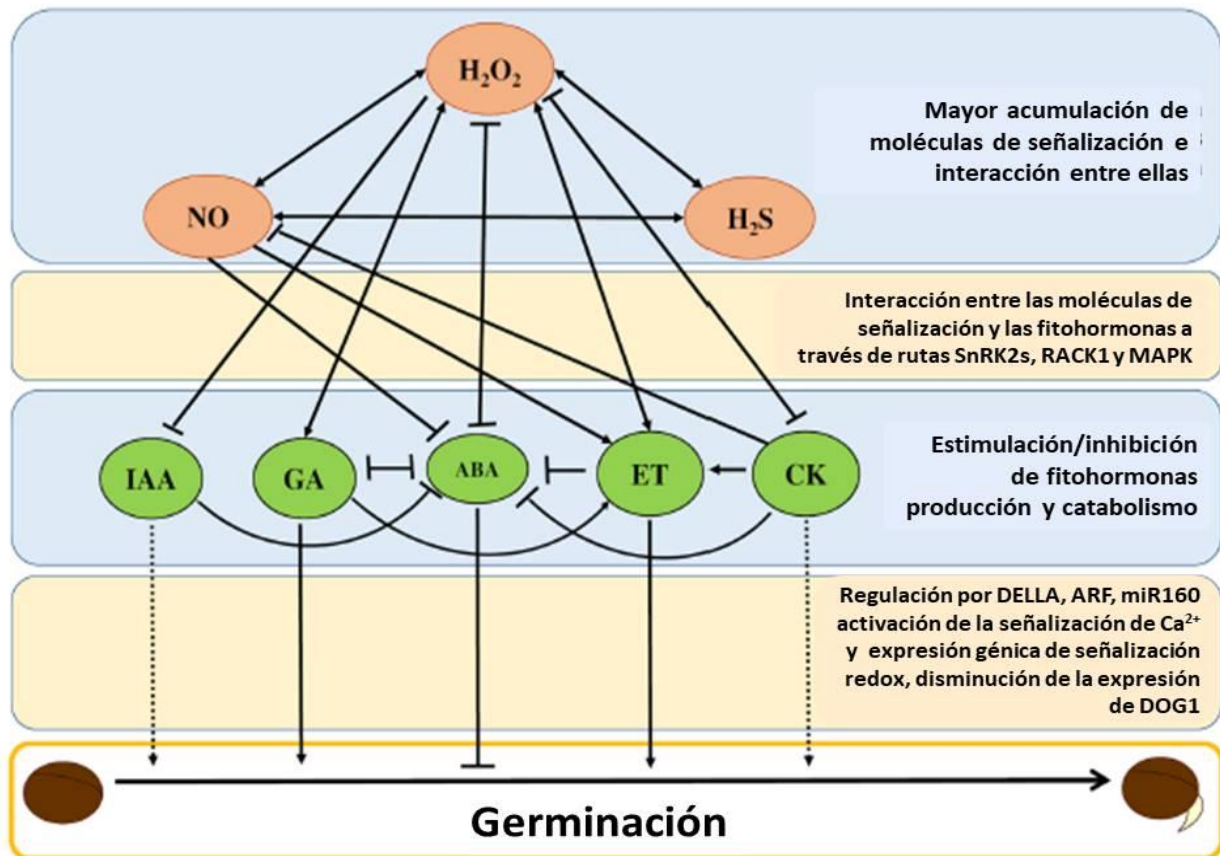


Figura 11: Esquema que muestra la relación entre peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) y ácido sulfhídrico (H_2S) y las interacciones asociadas con las fitohormonas para el control de la germinación de las semillas. Auxina (IAA), ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), citoquina (CK) (Wojtyla y col 2015).

En semillas dicotiledóneas el endospermo se caracteriza por tener una alta resistencia mecánica, por lo cual, el debilitamiento de éste es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de germinación. Para esto se requiere del ablandamiento de la pared celular mediante dos mecanismos: enzimático (p. ej. endo- β -1,4-mananasas, pectina-metilesterasas, celulasas) y no enzimático (p. ej. EROs; incluido O_2 , H_2O_2 y $\bullet OH$) (Li y col 2017). Lariguet y col (2013) reportan resultados que muestran que las EROs, y principalmente el H_2O_2 , tienen un papel importante durante la ruptura de la testa y el endospermo en *Arabidopsis*, ya que el H_2O_2 probablemente regula la expresión de genes que codifican enzimas que hidrolizan estas estructuras de la semilla, lo que ayuda a superar la restricción del crecimiento del embrión; En general, los EROs podrían actuar como moléculas de señalización y activar la transcripción de diversos genes relacionados con la regulación de EROs y del ablandamiento de la pared celular, como las peroxidasas de clase III, a través de la modificación covalente, y generalmente irreversible, de proteínas (Ghezzi y Bonetto 2003; Møller y col 2007).

Por otro lado, en plántulas de trigo crecidas bajo condiciones de salinidad se ha demostrado que el H_2O_2 actúa como señalizador que activa rutas que inducen la acumulación de antioxidantes en semilla, condición que persiste en las plántulas para compensar el daño oxidativo inducido por iones, y a la vez favorecen el crecimiento de plántulas (Wahid y col 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

El consumo de productos naturales que beneficien a la salud es una importante tendencia en el mundo. En la búsqueda de estos productos, se ha optado por estudiar algunos cultivos de importancia en la región, los cuales además de ser de fácil acceso, presenten propiedades nutraceuticas necesarias para contribuir a prevenir o tratar los problemas que aquejan a la sociedad. Sinaloa es uno de los principales productores de garbanzo (*Cicer arietinum L.*) blanco Sinaloa-92, semilla de amplia aceptación en el ámbito mundial. En general se ha registrado que los productos germinados tienen un mejor balance de nutrimentos y compuestos con actividad biológica (fenólicos, isoflavonas) que las semillas que le dieron origen. El consumo de productos con mayor contenido de estos compuestos resulta en beneficios para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades crónico degenerativas derivadas del estrés oxidativo. El perfil de fitoquímicos en germinado de garbanzo depende de las condiciones de germinación, y un factor de gran influencia es la exposición de las semillas a especies reactivas de oxígeno. En general, el tratamiento con H_2O_2 durante la germinación de semillas mejora la calidad de los germinados. En particular en esta investigación se evaluará el efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante la imbibición de semilla de garbanzo (*Cicer arietinum L.*) blanco Sinaloa-92 como alternativa para mejorar la calidad del producto germinado, al incrementar los niveles de compuestos fenólicos, flavonoides y su capacidad antioxidante. En un futuro, la información generada de este estudio fomentará la inclusión en la dieta de estos germinados con alto

contenido de fitoquímicos y su empleo como ingrediente para el desarrollo de otros productos de alto valor agregado.

V. HIPÓTESIS

La aplicación de H_2O_2 como elicitador químico induce la germinación, incrementa el valor nutricional y contenido de fitoquímicos relacionados con capacidad antioxidante en garbanzo blanco.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de H_2O_2 en la etapa de imbibición sobre el comportamiento germinativo, valor nutricional y nutracéutico de garbanzo blanco.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto del pretratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2 sobre el porcentaje de germinación y crecimiento de garbanzo.

2. Establecer las mejores condiciones (concentración de H_2O_2 / tiempo de germinación) para la obtención de garbanzo germinado con niveles altos de fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante.

3. Comparar la composición química proximal y digestibilidad de proteína de garbanzos germinados y no germinados.

4. Evaluar cambios en el perfil y contenido de isoflavonas como resultado del proceso de germinación con H_2O_2 .

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES:

Se utilizaron semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) blanco Sinaloa-92 cosechado en el periodo 2017 en el ejido Campo Plata, Angostura, Sinaloa, México.

Todos los reactivos empleados fueron de marcas registradas como Sigma y J.T. Baker (Phillisburg, N.J, USA).

B. MÉTODOS

1. Proceso de germinación

Las semillas de garbanzo se lavaron con agua y desinfectaron por inmersión en una disolución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 10 min. Después se enjuagaron exhaustivamente para eliminar el desinfectante residual. Lotes de 25 semillas desinfectadas fueron embebidas con agua o soluciones acuosas de peróxido de hidrógeno (5, 17.5, 30 y 35 mM) durante 24 h a temperatura ambiente. La relación entre el peso de las semillas y el volumen de la disolución de imbibición fue de 1:5 (p/v) (Farooq y col 2006). Posteriormente, se colocaron en charolas con papel filtro humedecido con agua destilada y se incubaron a 25 °C en oscuridad y humedad relativa de 90% durante 12, 42, 72 ó 84 h posteriores a las 24 h del periodo de imbibición. Se realizaron cinco réplicas por cada tratamiento de germinación; una réplica fue empleada para evaluar parámetros morfométricos en las semillas germinadas, mientras que las otras cuatro fueron almacenadas a -80°C para su posterior liofilización y obtención de harinas.

2. Comportamiento germinativo

El comportamiento germinativo de las semillas pretratadas fue evaluado a distintas concentraciones de H_2O_2 durante 12, 24, 48 y 72 h. El porcentaje de germinación se calculó empleando la ecuación 1 de acuerdo con lo reportado por Farooq y col (2006):

$$PG = \frac{N^{\circ} SG}{N^{\circ} TS} \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

PG: Porcentaje de germinación

N°SG= número de semillas germinadas

N°TS= número total de semillas

El índice de germinación (IG), definido como la medida del tiempo de germinación, fue calculado mediante la ecuación 1 de acuerdo con lo reportado por González-Zertuche y Orozco-Segovia (1996):

$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N} \quad (1)$$

Dónde:

IG: índice de germinación

n_i : número de semillas germinadas en el día i

t_i : número de días después de la siembra

N: total de semillas sembradas

3. Parámetros morfométricos

La morfología de los germinados de garbanzo se determinó de imágenes tomadas inmediatamente después de cumplirse el tiempo de germinación de cada uno de los tratamientos, esto para prevenir que la deshidratación interfiera con la correcta medición de los parámetros de interés.

a. Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes de los germinados de garbanzo obtenidos en el presente trabajo se realizó en un sistema cerrado con fondo negro sin brillo y con iluminación constante de luces LED (caja de madera con dimensiones de 50 x 50 cm), permitiendo así obtener imágenes con las mismas condiciones de iluminación, distancia y fondo, que ayuda a eliminar interferencias al momento de hacer la captura de la imagen (García-Armenta 2015). La captura de las imágenes fue realizada utilizando una cámara digital (Nikon, COOLPIX P900). La obtención de datos comparables y fácilmente manejables requirió del uso de unidades convencionales; el sistema de toma de fotografías planteado permite capturar la imagen de un objeto de dimensiones conocidas y establecer la equivalencia para convertir pixeles en centímetros. Cada imagen capturada constó de 30 muestras de germinados por tratamiento y todas la imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato bmp (mapa de bits) en el espacio de color RGB (24 bits).

b. Análisis morfométrico

El análisis morfométrico se realizó mediante el procesamiento de las imágenes de los germinados con el software Image J v. 1.50i (Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos). El pre-procesamiento de las imágenes consistió en convertir las imágenes de color (RBG 24 bits) a imágenes en escala de grises (8 bits). Posteriormente, el filtro MultliThresholder fue aplicado a la imagen en escala de grises para convertirla a imagen binaria empleando los algoritmos Otsu o Li, dependiendo de las características de la imagen. Por último, los parámetros de interés fueron seleccionados, perímetro y área, para a partir de ellos obtener el largo y ancho tanto de raíz como de plúmula de los germinados.

4. Obtención de harinas

Los germinados obtenidos de cada tratamiento se liofilizaron y molieron en un molino de café marca Krups modelo GX410011; las harinas obtenidas se tamizaron a través de una malla 80 (tamaño de partícula 0.180 mm) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

5. Obtención de extractos

La harina del germinado (0.5 g) se mezcló con 10 mL de acetona/etanol/agua (2:2:1 v/v) conteniendo 0.1% de ácido acético en la disolución, manteniéndolo en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 4000 g por 10 min, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20 °C

hasta su utilización (Wu y col 2012). Este extracto fue utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante.

6. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se evaluaron empleando la metodología propuesta por Singleton y col (1999). En una placa transparente de 96 pocillos se mezclaron 20 μL de la muestra (extracto o estándar) con 180 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu en 8 mL de agua destilada) y 50 μL de carbonato de sodio al 7%. La placa fue inmediatamente incubada en oscuridad durante 90 min a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo la placa fue leída en un lector de microplacas (SynergyTM HT Multidetector, Biotek, Inc., Winooski, VT) a 750 nm. El estándar utilizado fue ácido gálico (AG), se preparó una disolución concentrada de 1000 ppm y con las diluciones se construyó una curva de calibración; el contenido de fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra en base seca (mg EAG/ 100 g b.s.). Las evaluaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

7. Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinaron empleando la metodología propuesta por Heimler y col (2005). En una placa transparente de 96 pocillos se mezclaron 20 μL de la muestra (curva o extracto) con 100 μL de agua destilada y 6 μL de NaNO_2 al 5 %, se mantuvo en reposo 5 min y se agregaron 12 μL de AlCl_3 al 10 %. Posterior a un reposo de 5 min, se adicionaron 40 μL de NaOH 1M y 22 μL de agua destilada. La placa fue inmediatamente incubada en oscuridad durante 30 min a temperatura

ambiente; transcurrido el tiempo la placa fue leída en un lector de microplacas (SynergyTM HT Multidetecction, Biotek, Inc., Winooski, VT) a 510 nm. El estándar utilizado fue catequina (CA), se preparó una disolución concentrada de 1000 ppm y con diluciones se construyó una curva de calibración. El contenido de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de catequina por 100 g de muestra, en base seca (mg ECA/ 100 g b.s.). Las evaluaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

8. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó utilizando el método de ABTS (2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6- ácido sulfónico) propuesto por Re y col (1999). El cual se basa en la reducción del radical ABTS^{•+} por los antioxidantes presentes en los extractos obtenidos. Para la preparación de radical, 0.0192 g de ABTS se disolvieron en 5 mL de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2.45 mM y la mezcla se dejó reposar en oscuridad durante 16 h. Una alícuota del radical ABTS^{•+} se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.700 a 735 nm. Se tomó una lectura del blanco de reactivos. En tubos de 2 mL se mezclaron 20 µL de la muestra (extracto o curva) con 1980 µL del radical. Se inició el conteo de 15 min de incubación a temperatura ambiente inmediatamente después de la adición del radical; transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 735 nm. El estándar utilizado fue trolox (T), se preparó una disolución concentrada de 800 µg/mL y con diluciones se construyó una curva de calibración. Los resultados fueron expresados µmol equivalentes de trolox por 100 g de muestra en base seca (µM ET/ 100 g b.s.). Las evaluaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

9. Optimización de condiciones de germinación

Para estudiar el efecto del H_2O_2 y a la vez establecer las mejores condiciones (concentración de H_2O_2 / tiempo de germinación) para la obtención de germinados de garbanzo con niveles altos de compuestos fitoquímicos y capacidad antioxidante, se utilizó la metodología de superficie de respuesta. La optimización se realizó aplicando un diseño experimental central compuesto rotatable con un valor de $\alpha = 1.41421$ (**Cuadro 5**), las variables independientes fueron el tiempo de germinación (tG) y la concentración de H_2O_2 ($[H_2O_2]$), con cinco niveles (dos factoriales, dos axiales, un central) (Khuri y Cornell 1987). Los valores mínimos/máximos para el tiempo de germinación ($X_1 = tG$) y la concentración de H_2O_2 ($X_2 = [H_2O_2]$) fueron 0/84 h y 0/35 mM, respectivamente. El software estadístico arrojó 13 tratamientos (**Cuadro 6**). Las variables de respuesta seleccionadas fueron el contenido de fenólicos totales ($Y_1 = CFT$), flavonoides totales ($Y_2 = FT$) y capacidad antioxidante ($Y_3 = CaOx$). El siguiente modelo “en caja negra” representa la relación entre los factores y las variables de respuesta:

Variables independientes	Proceso	Variables de respuestas
$X_1 = tG$ $X_2 = H_2O_2$	$\Rightarrow Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii} X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=1+1}^2 \beta_{kij} X_i X_j + \varepsilon$	$\Rightarrow$ $Y_1 = CFT$ $Y_2 = FT$ $Y_3 = CaOx$

Cuadro 5. Diseño experimental central compuesto rotatable, de dos variables de proceso: tiempo de germinación (tG) y concentración de H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) ($\alpha=1.4142$)

Factores	-α	-1	0	+1	+α
Tiempo de germinación (h)	0	12.3	42	71.7	84
Concentración de H_2O_2 (mM)	0	5.13	17.5	29.9	35

Cuadro 6. Combinaciones de concentración de peróxido de hidrógeno ($[H_2O_2]$) y tiempo de germinación (tG) para la obtención de germinados de garbanzo.

Trat.	$[H_2O_2]$ (mM)	tG (h)
1	5	12
2	30	12
3	5	72
4	30	72
5	0	42
6	35	42
7	17.5	0
8	17.5	84
9	17.5	42
10	17.5	42
11	17.5	42
12	17.5	42
13	17.5	42

Compuestos fenólicos totales (CFT); Flavonoides totales (FT); Capacidad antioxidante (CaOx).

La expresión dentro de la “caja negra” representa CFT, FT y CaOx cuando $k=1, 2$ y 3 , respectivamente; β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} y β_{kij} representan la constante y los efectos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente. X_i , X_i^2 y X_iX_j representan los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables independiente, respectivamente; ε representa el error, considerado por la incapacidad para determinar el modelo verdadero. Después del análisis de regresión se eliminaron los términos no significativos ($p>0.1$) y se estableció un nuevo polinomio, correspondiente al modelo de predicción para cada variable de respuesta (Myers y col 2002).

Para encontrar la mejor combinación de las variables de proceso se utilizó el método convencional gráfico. Los modelos de predicción permitieron representar gráficamente cada variable de respuesta (CFT, FT y CaOx), y estas fueron sobrepuestas para obtener un sólo gráfico de contorno donde se observó y seleccionó el área con la mejor combinación (región óptima) de las variables de proceso, tiempo de germinación (tG) y concentración de H_2O_2 ($[H_2O_2]$) que permitiera obtener los valores máximos de todas las variables de respuesta.

10. Composición química

a. Proteína cruda

La proteína cruda se determinó por el método 46.12, microKjeldahl, de la AOAC (1999) mediante la determinación del contenido de nitrógeno. La harina (0.2 g) se mezcló con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla de catalizador, y las muestras se colocaron en el equipo digestor a una temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 h. El digesto se

diluyó con 10 mL de agua, se mezcló con NaOH al 40% y se destiló; el destilado se recibió en soluciones de ácido bórico al 4% con el indicador azul de metileno. La titulación se realizó con una disolución 0.1 N de HCl. Finalmente, la proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total por el factor 6.25 y los resultados se reportaron en % de proteína en base seca. La prueba se realizó por triplicado.

b. Grasa cruda

El contenido de grasa total se determinó por el método 920.39 C de la AOAC (1999). La harina (2 g), colocada en papel filtro Whatman #1 se introdujo en dedales de extracción que fueron colocados en el equipo Soxhlet. La extracción se realizó durante 4 h con éter de petróleo que fue recolectado en matraces (previamente puestos a peso constante). El éter de los matraces fue evaporado y el contenido de grasa fue calculado por diferencia de peso de los matraces. Los resultados se reportaron en % de grasa en base seca. La prueba se realizó por triplicado.

c. Cenizas

El contenido de cenizas se evaluó de acuerdo con el método 925.098 reportado por la AOAC (1999). 1 g de harina se colocó en un crisol (previamente puesto a peso constante) y fue calcinada en una mufla a 550°C por 12 h. Las cenizas de color blanco-grisáceo se enfriaron y pesaron. Los resultados se reportaron en % de cenizas en base seca. Los ensayos se realizaron por triplicado.

d. Humedad

El contenido de humedad se determinó por el método 44.15 de la AOAC (1999). La muestra (2 g) fue secada a 80 °C por 24 h y la pérdida de peso se utilizó para calcular el % de humedad. La prueba se realizó por triplicado.

e. Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia de 100 de los demás macrocomponentes (proteína cruda, grasa cruda y cenizas).

11. Digestibilidad de proteína *in vitro*

La digestibilidad de proteína *in vitro* fue determinada por la metodología propuesta por Hsu y col (1977) con modificaciones de Tinus y col (2012). El método implica la digestión con un sistema multienzimático constituido por 16 mg de tripsina pancreática porcina tipo IX-S (Sigma T-0303, 13,000- 20,000 BAEE unidades/ mg de proteína), 31 mg de quimotripsina pancreática bovina tipo II (Sigma C-4129, ≤ 40 unidades 7 mg de proteína), y 13 mg de proteasa tipo XIV (Sigma P5147 proteasa de *Streptomyces griseus*, ≥ 3.5 units/ mg solidos) en 10 mL de agua destilada a 37°C y pH 8. Se pesó el equivalente a 62.5 mg de proteína de la muestra y se rehidrató en 10 ml de agua destilada a 37°C durante 1 h en agitación constante a 85 rpm; transcurrido el tiempo se ajustó el pH de la suspensión a 8 con NaOH o HCl al 0.1 M. posteriormente se añadió 1 mL de solución multienzimática y se registró el cambio de pH a los 10 min. La digestibilidad proteínica fue calculada mediante la ecuación 3:

$$\text{DPIV} = 65.66 + 18.10\Delta\text{pH}_{10\text{min}} \quad (3)$$

12. Perfil de isoflavonas

a. Separación e identificación

El perfil de isoflavonas fue determinado en extractos obtenidos como se describe en el punto 5 de esta sección. La identificación de las isoflavonas se hizo en extractos de semilla sin germinar (200 mg/mL); el análisis de los extractos de las harinas control y optimizadas se realizó a partir de soluciones de 50 mg/mL. El análisis se realizó por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) utilizando la metodología propuesta por Quintero-Soto y col (2018), con modificaciones. El UPLC es modelo ACCELA y cuenta con un detector de arreglo de diodos (DAD) (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA). El volumen de inyección fueron 10 µL. La separación se realizó en una columna LUNA C18 (150 x 4.6 mm). La fase móvil consistió de 0.1% ácido fórmico en agua (A) y acetonitrilo (B) con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min, aplicándose un gradiente de 0.5 a 60% de B en 25 min; la columna fue reequilibrada con 100 % de la fase A y el tiempo total de corrida fue de 35 min. La detección se realizó a 260 y 295 nm. La identificación se realizó considerando los tiempos de retención, espectros UV de los picos cromatográficos, su comparación con espectros reportados en la base de datos PubChem y con el estándar comercial (formononetina). La identidad de los compuestos fue confirmada mediante los espectros de masas obtenidos con un equipo LTQ-XL (Thermo Scientific, EUA) con fuente de ionización por electroasperjado (ESI); el análisis fue en modo positivo/negativo y aplicando un voltaje de 35 V y temperatura del capilar de 300 °C. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software Xcalibur versión 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, EUA).

b. Cuantificación

El contenido de isoflavonas se determinó mediante una curva de calibración del estándar comercial de formononetina. El contenido de isoflavonas totales se expresó en μg equivalentes de formononetina/ g de muestra.

13. Análisis estadístico

El análisis de regresión (MSR) y predicción del comportamiento experimental de los datos, se llevaron a cabo utilizando modelos lineales con interacción y cuadráticos, usando el programa estadístico Design Expert 7.0.

Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. COMPORTAMIENTO GERMINATIVO

Para el estudio del efecto del H_2O_2 sobre el comportamiento germinativo de garbanzo blanco, se calculó el porcentaje de germinación (PG) y el índice de germinación (IG) en diferentes tratamientos.

1. Porcentaje de germinación

Los tratamientos con H_2O_2 tuvieron un efecto positivo en la germinación de la semilla de garbanzo desde la etapa correspondiente a las 24 h de imbibición; por lo tanto, al tiempo 0 (0 h post-imbibición), ya se observa que el peróxido induce la germinación mostrando un patrón dependiente de la concentración entre 5 y 30 mM, mientras que las semillas embebidas sólo en agua no alcanzaron a germinar a este tiempo (**Cuadro 7**). Entre las 24 y 72 h post-imbibición se confirma el efecto positivo del peróxido sobre el porcentaje de germinación (PG); de manera general, los valores de PG a cada concentración de H_2O_2 entre 5 y 30 mM fueron estadísticamente iguales, aunque es claro que el mejor efecto se registró a 5 mM; mientras que 35 mM de peróxido afectó negativamente la germinación (**Cuadro 7**). En relación con el efecto del tiempo post-imbibición sobre el PG, los valores mayores se alcanzaron a las 48 h para todos los tratamientos (**Cuadro 7**).

Jakhar y Jakhar 2015 y Ammer y col 2018 reportaron valores de PG de garbanzo, sin la adición de agentes elicitores, mayores al 78 % y 80%, respectivamente. Estos porcentajes son superiores a los del presente estudio, probablemente debido al uso de diferentes variedades de garbanzo y sobre todo a

Cuadro 7. Porcentaje de germinación de garbanzo blanco Sinaloa-92 en semillas tratadas con H₂O₂. Efecto de la concentración de H₂O₂ y del tiempo posterior al periodo de imbibición.

Concentración de H ₂ O ₂ (mM)	PG a diferentes tiempos (h)			
	0	24	48	72
0	0 ^{eB}	38.89 ^{dA}	41.11 ^{dA}	41.11 ^{dA}
5	2.50 ^{dC}	81.11 ^{aB}	91.11 ^{aA}	91.11 ^{aA}
17.5	14.16 ^{cC}	72.5 ^{bcB}	87.78 ^{abA}	87.78 ^{abA}
30	31.67 ^{aB}	78.33 ^{abA}	80.00 ^{bcA}	80.00 ^{bcA}
35	23.33 ^{bB}	66.67 ^{cA}	72.22 ^{cA}	72.22 ^{cA}

Nota: Se usaron cuatro lotes de 25 semillas para cada tratamiento para calcular los porcentajes. Germinación a 37°C en oscuridad. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas; letras mayúsculas diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (Duncan, p<0.05).

que emplearon 7 días de germinación.

Liu y col 2010 y Barba-Espín y col 2012 reportaron un efecto positivo del tratamiento H_2O_2 en el PG en semillas de *Arabidopsis* y chícharo, respectivamente, el efecto fue dependiente de la concentración. Ambos estudios mostraron que concentraciones mayores a 40 mM inducían el crecimiento anormal de las plántulas y disminuían el PG. En otra investigación, el pre-tratamiento con H_2O_2 (20 mM) aplicado a semillas de chícharo fue similar al del presente estudio; y se registró germinación desde la imbibición, el PG fue 14% a las 12 h y 75% a las 24 h; mientras que las semillas tratadas con agua sólo alcanzaron 15% de semillas germinadas (Wojtyla y col 2016). El mismo efecto inductor de germinación en la etapa de imbibición fue observado en el presente estudio. La información generada claramente establece que el H_2O_2 induce la germinación, lo que indica que el peróxido rompe la dormancia de las semillas. Probablemente, el peróxido, en conjunto con otras moléculas, inhibe la acción del ácido abscísico (ABA), citoquinina (CK) y auxina (IAA); mientras que aumenta los niveles de ácido giberélico (GA) y etileno (ET). Es decir, el fenómeno se ha asociado al efecto combinado de moléculas de señalización y fitohormonas que modifican las cascadas de señalización que regulan la transición del estado de latencia al de germinación (Wojtyla y col 2016). Por otra parte, la disminución del PG a concentraciones altas de H_2O_2 (>35 mM) puede deberse a su capacidad para provocar estrés oxidativo, dañar biomoléculas e inducir la pérdida en la viabilidad de las células (Wojtyla y col 2016).

2. Índice de germinación

El índice de germinación (IG) indica el tiempo de germinación de las semillas en relación con su capacidad germinativa (Pavón y col 2011). El IG de las semillas de garbanzo, evaluado a las 72 h de germinación, presentó los mayores valores en las muestras tratadas con H_2O_2 ($p < 0.05$); el efecto fue mayor entre 5 y 30 mM de peróxido, aunque los valores son similares, y el mayor valor se alcanzó a 5 mM; mientras que el IG disminuyó a 35 mM (**Cuadro 8**).

De esta manera se demuestra que el H_2O_2 incrementa la capacidad germinativa de las semillas de garbanzo, aumentando la germinación tanto en porcentaje (PG) como en velocidad.

Khan y Khan 2015 reportan el IG a los 10 días de germinación de tres variedades de garbanzo pigmentado, teniendo valores que van de 2.42 a 3.69, los cuales son similares a los obtenidos en el presente estudio para el tratamiento sin H_2O_2 .

B. MORFOMETRÍA DE RAÍZ Y PLÚMULA

Los parámetros morfométricos de la raíz y la plúmula de las semillas germinadas fueron evaluados en los 13 tratamientos generados por el diseño experimental (**Cuadro 6**).

1. Longitud y diámetro

Al analizar los datos tomando en cuenta los tratamientos con el mismo tG, se registra una tendencia hacia mayores longitudes de raíz en los tratamientos con mayor concentración de peróxido (**Cuadro 9**); enfocándose en el tG=42 h, se registra

Cuadro 8. Índice de germinación de garbanzo blanco Sinaloa-92 en semillas tratada con H₂O₂

Concentración de H ₂ O ₂ (mM)	Índice de germinación
0	2.44 ^d
5	5.37 ^a
17.5	4.98 ^{ab}
30	4.81 ^b
35	4.28 ^c

Nota: Se usaron cuatro lotes de 25 semillas para cada tratamiento para calcular los índices. Calculado a las 72 h de germinación. Letras minúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Cuadro 9. Efecto del pretratamiento con H₂O₂ en la longitud y diámetro de raíz y plúmula.

[H ₂ O ₂]	tG	Raíz		Plúmula	
		Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)
17.5	0	0.58 ^c	0.25 ^{abc}	NP	NP
5	12	0.67 ^c	0.22 ^c	NP	NP
30	12	1.05 ^c	0.23 ^{abc}	NP	NP
0	42	1.73 ^b	0.24 ^{abc}	NP	NP
17.5	42	2.08a ^b	0.25 ^{abc}	NP	NP
35	42	2.24 ^a	0.26 ^{ab}	0.56 ^b	0.18 ^c
5	72	2.35 ^a	0.26 ^{ab}	0.79 ^b	0.23 ^{ab}
30	72	2.46 ^a	0.26 ^a	1.30 ^a	0.26 ^a
17.5	84	2.41 ^a	0.23 ^{bc}	0.68 ^b	0.19 ^{bc}

Nota: Se analizaron 30 germinados por tratamiento. NP: No presentó. Letras minúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas (Duncan, p<0.05).

efecto concentración-respuesta, obteniéndose diferencia significativa ($p < 0.05$) al contrastar la respuesta entre el uso de 0 mM y 35 mM de H_2O_2 . Considerando los tratamientos donde se aplica la misma concentración de peróxido se observa un incremento en el longitud de la raíz con el tG, lo que se demuestra claramente a 17.5 mM ($p < 0.05$). Por otra parte, el H_2O_2 no parece generar un efecto drástico en el diámetro de la raíz, ya que los resultados obtenidos oscilan entre 0.22 y 0.26 cm. Estos resultados son de gran importancia dado que una característica importante para el éxito en el establecimiento y supervivencia de las plantas es el crecimiento y desarrollo de la raíz (Ateca y col 2009). Además Saleh y col (2017) encontraron una correlación entre el incremento en la longitud de radículas de diferentes leguminosas, entre ellas el garbanzo, con el incremento en el contenido de fenólicos totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante, características de gran importancia para la presente investigación.

La plúmula es la parte del embrión de una planta que al desarrollarse da lugar al tallo, la presencia de ésta podría indicarnos un mayor desarrollo de la plántula (Ateca y col 2009). Considerando los tratamientos con los mismos tG se observa la nula presencia de plúmula de 0 a 42 h, sin embargo, se pudo observar el claro efecto concentración-respuesta al encontrar la presencia de esta estructura en el tratamiento elicitado con de 35 mM de H_2O_2 a las 42 h, sin embargo, el crecimiento acelerado de dicha estructura parece generar una disminución en el diámetro de la misma. Tomando en cuenta los tratamientos donde se aplica la misma concentración de peróxido, se observa un incremento en el longitud de plúmula con el tG, lo que se demuestra claramente a 5 mM, 17.5 mM y 30 mM ($p < 0.05$).

Los valores más altos para longitud y diámetro tanto de raíz como de plúmula, fueron observados al emplear un tG= 72 h y una [H₂O₂]= 30 mM.

Jakhar y Jakhar 2015 reportaron una longitud de raíz y plúmula mayor a 4 y 1.5 cm, respectivamente, en garbanzo germinado durante 7 días (168 h), hecho que confirma el crecimiento de ambas estructuras en función del tiempo. Swieca 2015 midió la longitud y diámetro de raíz y plúmula de germinados de lenteja elicitados con H₂O₂ (15 y 150 mM), sin encontrar diferencias significativas entre el tratamiento control y los elicitados, obteniendo valores que oscilan entre 1.80 - 1.99 cm a los dos días y entre 2.81 - 3.13 cm a los tres días de germinación.

Barba-Espin y col 2012 reportó la longitud de plántulas de chícharo a las 48 h de germinación, sin encontrar diferencia significativa entre el tratamiento control y los elicitados con concentraciones de 5 y 10 mM de H₂O₂, sin embargo la concentración de 20 mM resultó la más efectiva al obtener el valor significativamente más alto (3 cm).

Cabe destacar que los resultados obtenidos del comportamiento germinativo y las mediciones físicas de raíz y plúmula aportan información importante para la obtención de mayores rendimientos de granos germinados, que además presenten atributos físicos favorables.

C. MODELOS DE PREDICCIÓN PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H₂O₂ Y TIEMPO DE GERMINACIÓN

En el **Cuadro 10** se muestran las diferentes combinaciones de variables de proceso (tG y [H₂O₂]) utilizadas para la obtención de 13 harinas de garbanzo germinado

Cuadro 10. Diseño experimental y valores experimentales obtenidos.

Trat.	H ₂ O ₂ (mM)	tG (h)	CFT ^a (mg EAG/100 g)	FT ^a (mg ECA/100 g)	CAOx ^a (μmol ET/100 g)
1	5	12	58.45	13.41	1265.88
2	30	12	62.61	18.71	1332.59
3	5	72	89.56	21.23	1629.44
4	30	72	126.29	27.33	2117.18
5	0	42	69.89	13.80	1369.40
6	35	42	80.82	22.00	1772.74
7	17.5	0	59.55	20.39	942.77
8	17.5	84	147.69	30.58	2334.93
9	17.5	42	81.94	20.32	1573.07
10	17.5	42	76.85	21.92	1473.01
11	17.5	42	87.73	20.22	1651.33
12	17.5	42	75.54	20.77	1555.78
13	17.5	42	83.49	19.78	1529.90

^aValores en base seca; Compuestos fenólicos totales (CFT); Flavonoides Totales (FT); Capacidad antioxidante (CAOx)

elicitado con H_2O_2 y los valores experimentales de las variables de respuesta evaluadas (CFT, FT y CaOx); A partir de dichos datos (**Cuadro 10**) se obtuvieron los modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio “ $\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22}$ ”, que relacionan las variables de respuesta. En el **Cuadro 11** se muestran los coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos de predicción de primer y segundo orden mostrando las relaciones entre las variables de respuesta y variables del proceso. A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA) (**Cuadro 11**). Un buen modelo de predicción debe tener una R^2 ajustada (coeficiente de determinación) ≥ 0.80 , un nivel de significancia de $P < 0.05$, un coeficiente de variación (CV) $\leq 10\%$ y prueba de falta de ajuste > 0.01 (Myers y col 2002). Se utilizaron estos criterios para decidir el nivel de satisfacción de los modelos de predicción de cada una de las variables de respuesta.

1. Compuestos fenólicos totales

Las harinas obtenidas del garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 presentaron valores de compuestos fenólicos totales (CFT) en el rango de 58.45-147.69 mg EAG/100 g b.s. (**Cuadro 10**). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.05$) (**Cuadro 11**), el cual incluye los términos lineales de $[H_2O_2]$ y tG, los términos cuadráticos $([H_2O_2]^2, tG^2)$ y su interacción $([H_2O_2] * tG)$ (Ecuaciones 3 y 4).

Usando variables codificadas:

$$y_1 = 81.11 + 6.03X_1 + 27.61X_2 + 6.11X_1X_2 - 3.39X_1^2 + 9.57X_2^2 \quad (3)$$

Cuadro 11. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción que muestran la relación entre las variables de respuesta (CFT, FT y CAOx) y variables de proceso (tG y [H₂O₂]) para la obtención de harinas de garbanzo germinado elicitado con H₂O₂.

Coeficientes	Compuestos Fenólicos Totales (CFT)		Flavonoides Totales (FT)		Capacidad antioxidante (CaOx)	
	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
Intercepto β_0	81.11	58.09696	20.78	11.95771	1580.62	1041.27856
Lineal						
β_1	6.03	0.56422	2.88	0.62604	140.61	-0.66664
β_2	27.61	-0.27208	3.86	-0.067261	389.62	8.10690
Cuadrático						
β_1^2	-3.39	-0.022140	-1.82	-0.011900	NS	NS
β_2^2	9.57	0.010847	1.97	2.23269E-003	NS	NS
Interacción						
β_{12}	6.11	0.016615	0.20	5.44830E-004	105.26	0.28641
P modelo	<0.0001		<0.0001		<0.0001	
P falta de ajuste	0.4798		0.2045		0.0867	
CV	5.87		5.11		7.03	
R ²	0.9768		0.9683		0.9273	
R ² ajustada	0.9603		0.9456		0.9030	
R ² predicha	0.9089		0.8366		0.7595	

Nivel de significancia del modelo $P \leq 0.05$

Nivel de significancia de la falta de ajuste $P \geq 0.05$

NS No significativo

Usando variables decodificadas:

$$\text{CFT} = 58.09696 + 0.56422 (\text{H}_2\text{O}_2) - 0.27208 (\text{tG}) + 0.016615 (\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{tG}) - 0.022140 (\text{H}_2\text{O}_2^2) + 0.010847 (\text{tG}^2) \quad (4)$$

Este modelo de predicción explicó el 97.68% de la variabilidad total ($p \leq 0.0001$) de los valores de CFT de las harinas. El coeficiente de determinación (R^2 ajustada) del modelo fue 0.9603 y la falta de ajuste fue no significativa (0.4798). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 5.87% (**Cuadro 11**). Estos valores indican que el modelo experimental para CFT fue adecuado y reproducible.

Las gráficas de superficie de respuesta y contorno para CFT (**Figura 12**) muestran claramente la interacción de las variables $[\text{H}_2\text{O}_2]$ y tG, al aumentar la concentración y el tiempo se obtienen los valores más altos de CFT. De manera similar a los resultados de CFT de esta investigación, diversos autores reportan un incremento en el contenido de CFT, respecto al tiempo de germinación, tanto en garbanzo como en otros materiales (Khattak y col 2007; Ghiassi y col 2012; Wu y col 2012; Chinma y col 2015). Estos resultados pueden ser atribuidos tanto a la liberación de compuestos fenólicos que se encuentran unidos a la pared celular, como, a la biosíntesis derivada de una hidrólisis enzimática que permita mantener el equilibrio redox durante la germinación (Chinma y col 2015).

Por otro lado, Mendoza-Sánchez y col (2016) reportaron un incremento del CFT en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con diferentes concentraciones de H_2O_2

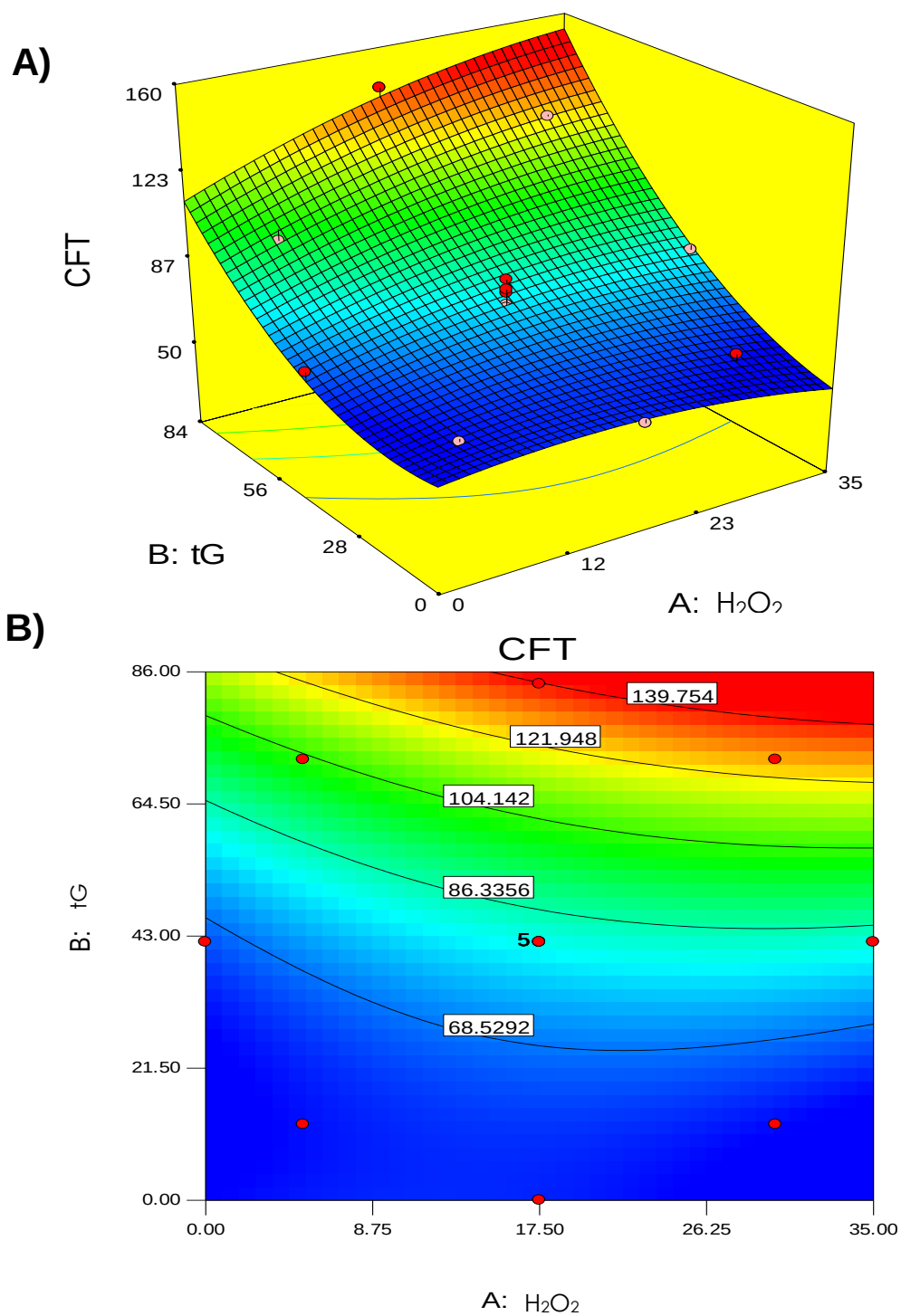


Figura 12. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) mostrando el efecto de las variables de proceso; concentración de peróxido de hidrógeno: $[H_2O_2]$ (mM); tiempo de germinación: tG (h), sobre el contenido de fenólicos totales [CFT (mg EAG/100 g)] de las harinas de garbanzo germinado elicitados con H_2O_2 .

(10, 20 y 30 mM) y germinadas por 3 días. Efectos similares del H₂O₂ se han registrado en la germinación de lenteja (*Lens culinaris* Medik.) y quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), y muestran que el tratamiento de los brotes con H₂O₂ induce actividades de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y tirosina amonio-liasa (TAL); enzimas clave en la biosíntesis de compuestos polifenólicos a través de la vía del ácido shiquímico (Swieca y Baraniak 2013; Swieca 2016).

2. Flavonoides totales

Las harinas obtenidas de garbanzo germinado elicitado con H₂O₂ presentaron valores de flavonoides totales (FT) de entre 13.4083 – 30.5757 mgEQ/100 g b.s. (**Cuadro 10**). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo (p<0.0001) para FT (**Cuadro 11**), el cual incluye los términos lineales de [H₂O₂] y tG, los términos cuadráticos ([H₂O₂]², tG²) y su interacción ([H₂O₂]*tG). (Ecuaciones 5 y 6)

Usando variables codificadas:

$$y_1 = 20.78 + 2.88X_1 + 3.86X_2 + 0.20X_1X_2 - 1.82 X_1^2 + 1.97 X_2^2 \quad (5)$$

Usando variables decodificadas:

$$FT = 11.95771 + 0.62604 (H_2O_2) - 0.067261 (tG) + 5.44830E-004 (H_2O_2 * tG) - 0.011900 (H_2O_2^2) + 2.23269E-003 (tG^2) \quad (6)$$

Este modelo de predicción explicó el 96.83% de la variabilidad total (p < 0.0001) de los valores de FT de las harinas. El coeficiente de determinación (R² ajustada) del

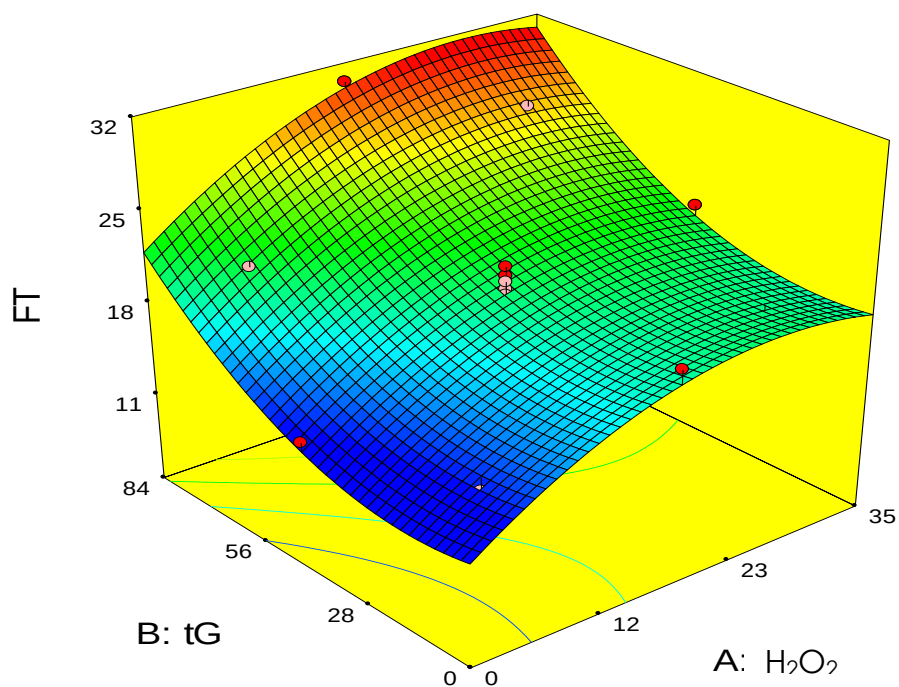
modelo fue 0.9456 y la falta de ajuste fue no significativa (0.2045). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 5.11 % (**Cuadro 11**). Estos valores indican que el modelo experimental para FT fue adecuado y reproducible.

Las gráficas de superficie de respuesta y contorno para FT (**Figura 13**) muestran el efecto de interacción de las variables $[H_2O_2]$ y tG, al aumentar la concentración y el tiempo se obtienen los valores más altos de FT. A tiempos cortos se puede observar que al aumentar la concentración de H_2O_2 se favorece la acumulación de FT. Efecto similar fue reportado en frijol variedad Dalia y lenteja, donde la inducción de estrés aplicando H_2O_2 favoreció el incremento en el contenido de FT, este efecto es atribuido a la inducción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). El incremento en la actividad de PAL, aunada a la presencia de niveles altos de ácido *p*-cumárico, que podría estar involucrado en la sobreproducción de coumaroil-CoA, compuesto clave en la biosíntesis de estos compuestos (Mendoza-Sánchez y col 2016; ´Swieca 2015).

3. Capacidad antioxidante

Las harinas obtenidas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 presentaron valores de capacidad antioxidante (CaOx) de entre 942.77 – 2334.93 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ de muestra en bs (**Cuadro 10**). El análisis de varianza mostró un modelo de interacción de dos factores (2FI) significativo ($p < 0.0001$) (**Cuadro 11**), el cual incluye

A)



B)

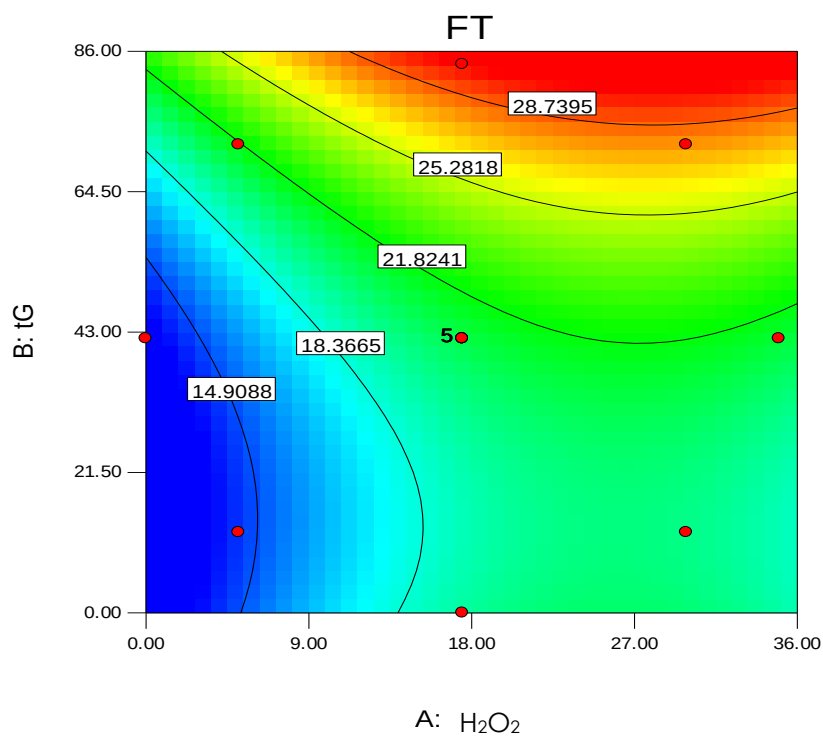


Figura 13. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) mostrando el efecto de las variables de proceso; concentración de peróxido de hidrógeno: $[H_2O_2]$ (mM); tiempo de germinación: tG (h), sobre flavonoides totales [FT (mg EQ/100 g)] de las harinas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 .

los términos lineales de $[H_2O_2]$ y tG, así como su interacción ($[H_2O_2] \cdot tG$) (Ecuaciones 8 y 9).

Usando variables codificadas:

$$y_1 = 1580.62 + 140.61X_1 + 389.62X_2 + 105.26X_1X_2 \quad (7)$$

Usando variables decodificadas:

$$CAOx = 1041.27856 - 0.66664 (H_2O_2) + 8.10690 (tG) + 0.28641 (H_2O_2 \cdot tG) \quad (8)$$

Este modelo de predicción explicó el 92.73 % de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores de CAOx de las harinas. El coeficiente de determinación (R^2 ajustada) del modelo fue 0.9030 y la falta de ajuste fue no significativa (0.0867). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 7.03 % (**Cuadro 11**). Estos valores indican que el modelo experimental para CAOx fue adecuado y reproducible.

En la **figura 14** se muestran las gráficas de superficie de respuesta y contorno para CaOx. La CaOx presenta un comportamiento similar al de CFT. Se muestra claramente la interacción de las variables $[H_2O_2]$ y tG al aumentar la concentración y el tiempo se obtienen los valores más altos de CaOx. Świeca (2015) reportó la correlación positiva entre CFT y FT con la CaOx (ABTS) en lenteja germinada bajo condiciones de estrés con H_2O_2 . Los resultados de CaOx del presente estudio podrían relacionarse al contenido de CFT y FT, debido a que presentan un comportamiento similar.

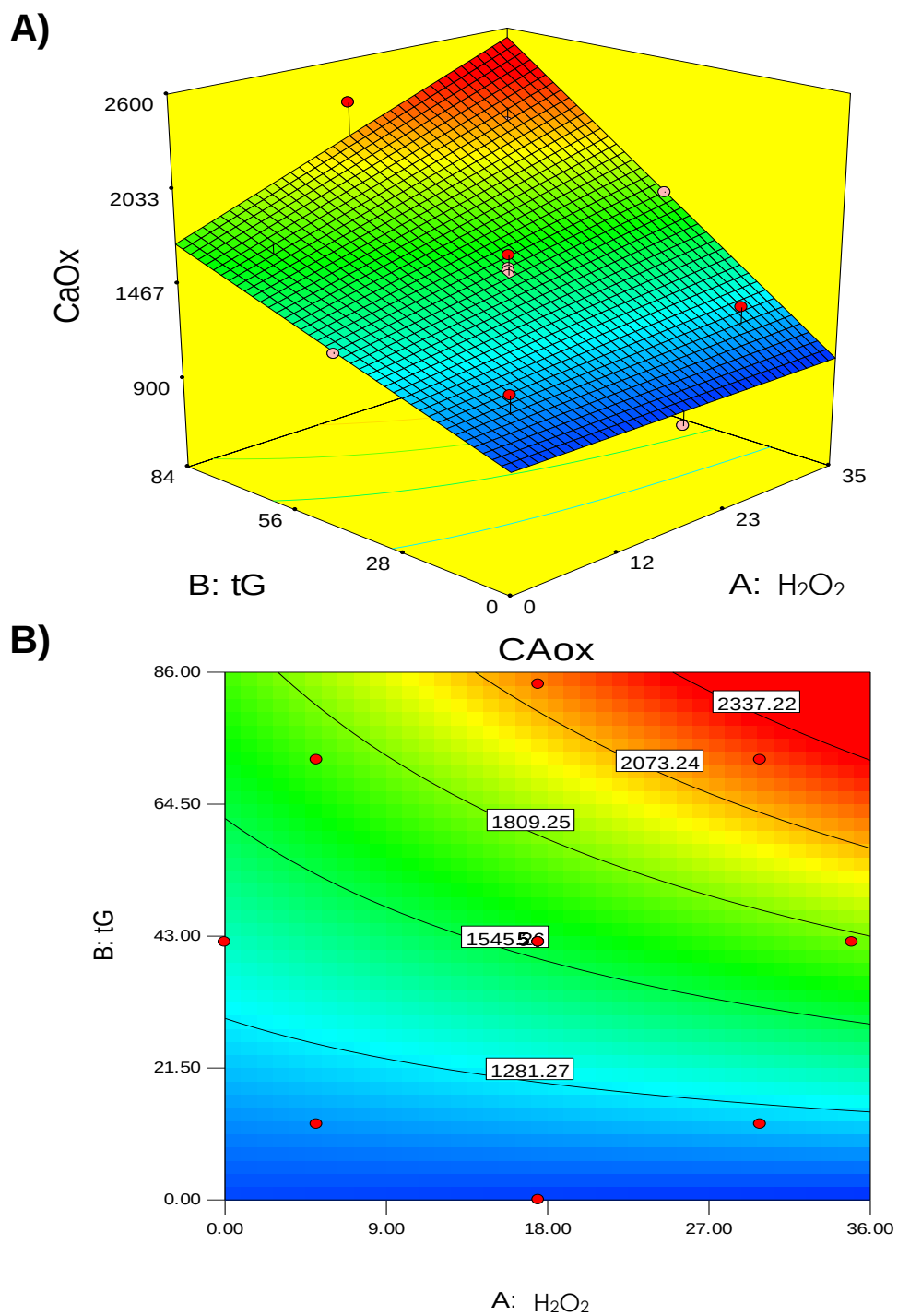


Figura 14. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) mostrando el efecto de las variables de proceso; concentración de peróxido de hidrógeno: $[H_2O_2]$ (mM); tiempo de germinación: tG (h), sobre capacidad antioxidante $[CaOx]$ ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$) de las harinas de garbanzo germinado elicitado con H_2O_2 .

D. OPTIMIZACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE H₂O₂ Y TIEMPO DE GERMINACIÓN

Para la optimización se tomaron en cuenta los resultados obtenidos de los parámetros físicos, y debido a que se observó que el tratamiento de 84 h de germinación presentaba características físicas indeseables (coloración oscura, mal olor y textura blanda), se decidió ajustar la variable de tG a un máximo de 72 h. La gráfica de optimización (**Figura 15**) para obtener las variables de proceso que maximicen las variables de respuesta (CFT, FT y CaOx) muestra que las condiciones óptimas son [H₂O₂]=30 mM y tG=72 h; los valores predichos en el punto óptimo son: CFT =127.9 mg EAG/100 g b.s., FT 27.9 mg EC/100 g b.s., y CaOx=2227.8 µM ET/100 g b.s. Para la validación de los modelos empleados, semilla de garbanzo blanco fue germinada a las condiciones óptimas obtenidas; y su CFT, FT y CaOx fueron determinados, obteniéndose los siguientes valores: CFT= 128.26 ± 10.77 mg EAG/100 g, FT= 27.81 ± 1.73 mg EC/100 g y CaOx= 2411.09 ± 202.45 µM ET/100 g. Los valores experimentales fueron muy cercanos a los predichos por los modelos, demostrando que el modelo tiene un buen ajuste experimental (**Cuadro 12**).

A. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H₂O₂ EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS GERMINADOS

El efecto del pretratamiento con H₂O₂ sobre el contenido de macronutrientes de germinados de garbanzo fue analizado contrastando los valores del contenido proximal de la semilla sin germinar con el de los germinados óptimo y control (**Cuadro 13**).

La composición proximal de la semilla sin germinar fue similar al registrado previamente para semillas de garbanzo blanco Sinaloa-92 (Heiras-Palazuelos y col 2012), con excepción de que reportan un contenido de proteínas superior (23.5%), la

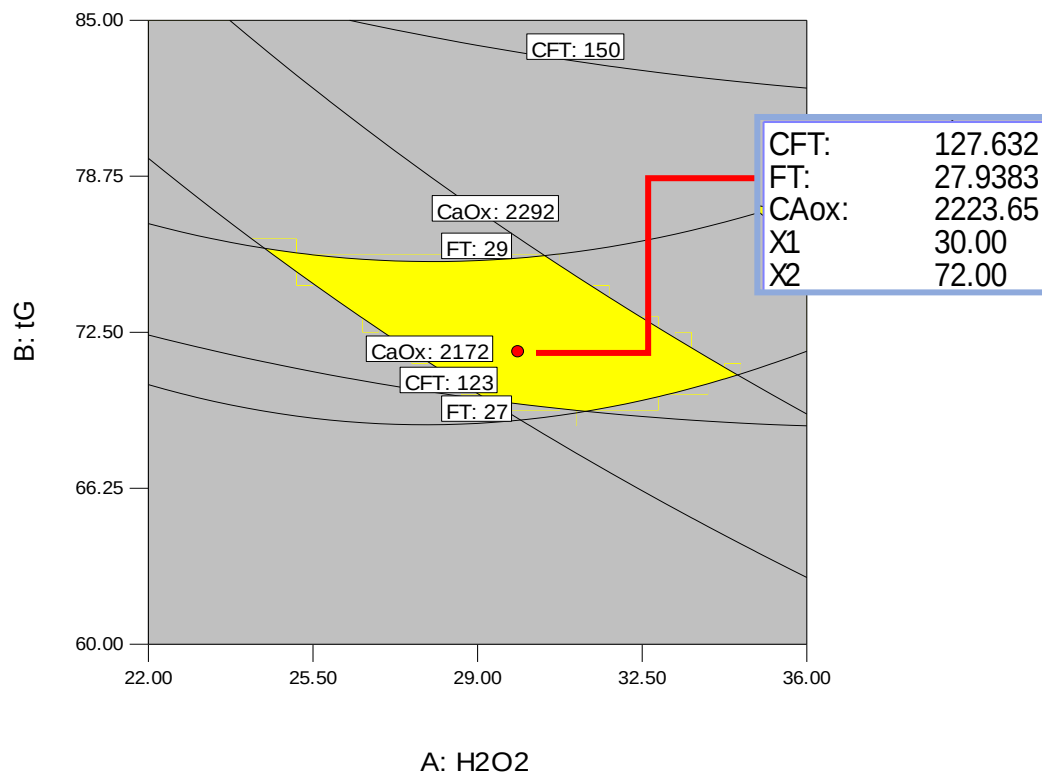


Figura 15: Gráfico de optimización para las variables de respuesta CFT, FT y CaOx. La zona amarilla muestra la región con la mejor combinación de las variables de proceso para la obtención de niveles altos de las tres variables de respuesta.

Cuadro 12. Valores predichos por los modelos y experimentales obtenidos en condiciones óptimas.

Valor predicho	Valor experimental
CFT = 127.632 mg EAG/100 g	CFT = 128.26 ± 10.77 mg EAG/100 g
FT = 27.9383 mg EC/100 g	FT = 27.81 ± 1.73 mg EC/100 g
CaOx = 2223.65 µM ET/100 g	CaOx = 2347.18 ± 199.38 µM ET/100 g
CFT= compuestos fenólicos totales; FT= Flavonoides totales; CaOx= Capacidad antioxidante. Datos en base seca.	

Cuadro 13. Efecto del pretratamiento con H₂O₂ sobre el contenido de macronutrientes.

	Semilla sin		
Proximal	germinar*	Óptimo*	Control*
%Proteína	15.98 ^c	18.70 ^b	19.99 ^a
%Lípidos	6.72 ^b	7.73 ^a	7.96 ^a
%Cenizas	3.02 ^a	2.77 ^b	2.62 ^b
%Carbohidratos	74.27 ^a	71.27 ^b	69.43 ^c

Nota: Letras diferentes en renglones representan diferencias significativas (Duncan, p<0.05). * Datos en base seca.

diferencia puede atribuirse a las condiciones ambientales en las cuales se realizó el cultivo de dichas semillas.

En contraste con los valores de las semillas sin germinar, la germinación resultó en un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de proteína y lípidos. El incremento en peso seco de estos macronutrientes es atribuido a la pérdida de carbohidratos durante el proceso de germinación de la semilla. La disminución en el contenido de cenizas es atribuida a una lixiviación de minerales durante la etapa de imbibición y el decremento en el contenido de carbohidratos, a que estos son la principal fuente de energía utilizada para el inicio de la germinación de la semilla (El-Adawy 2002, Perales-Sánchez y col 2014).

En el tratamiento óptimo se observó un decremento ($p < 0.05$) en el contenido de proteínas al ser comparado con el tratamiento control. Efecto similar fue reportado por Świeca y Baraniak (2013) observando que la inducción de la germinación de lenteja con H_2O_2 (20 mM) causó una disminución significativa en el contenido de proteína así como su digestibilidad a los 3 días de germinación. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la digestibilidad de proteína *in vitro* (DPIV) entre la semilla sin germinar, el tratamiento óptimo y el control, obteniendo valores de 68.68, 70.59 y 68.18%, respectivamente.

B. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H_2O_2 EN EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En contraste con los valores de las semillas de garbanzo sin germinar, la germinación indujo un incremento porcentual significativo ($p < 0.05$) en los tratamientos óptimo/ control de: CFT 281.70%/ 302.57%, FT 266.12%/ 264.21% y en la CaOx de 246.07%/ 214.49% (**Cuadro 14**). Comparando con nuestros resultados,

Cuadro 14. Efecto del pretratamiento con H₂O₂ sobre el contenido de compuestos fitoquímicos y capacidad antioxidante.

	Semilla sin		
	germinar	Óptimo	Control
CFT¹	45.53 ^b	128.26 ^a	137.76 ^a
FT²	10.45 ^b	27.81 ^a	27.61 ^a
CaOx³	953.86 ^c	2347.18 ^a	2045.93 ^b

Nota: Letras diferentes en renglones representan diferencias significativas (Duncan, p<0.05); ¹ mg EGA/ 100 g, ² mg ECA/ 100 g, ³ μM ET/ 100 g. Datos en base seca.

Saleh y col (2017) reportan mayores contenidos de fenólicos totales (CFT= 538 mg EAG/100 g b.s.) y flavonoides totales (FT= 843 mg equivalentes quercetina/100 g b.s.) en garbanzo sin germinar; las diferencias pueden estar asociadas al uso de diferentes técnicas de extracción y cuantificación, así como a la variedad de los granos analizados. Heiras-Palazuelos y col (2012) analizaron garbanzo blanco Sinaloa-92 sin germinar y encontraron un menor valor de CFT (14 mg EAG/100 g) y mayor de FT (15 mg ECA/100 g), probablemente debido a que la evaluación se realizó con extractos metanólicos.

Los germinados de los tratamientos óptimo y control presentaron valores de CFT y FT similares ($p>0.05$), mientras que la CaOx fue mayor para el del tratamiento óptimo ($p<0.05$). El incremento en la CaOx del germinado óptimo puede deberse a que, a pesar de no haber un incremento en CFT y FT, en este tratamiento óptimo podrían haberse sintetizado otros compuestos con mayor capacidad antioxidante como respuesta al estrés químico inducido por la aplicación de H_2O_2 .

Mendoza-Sánchez y col (2016) reportaron el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de H_2O_2 , incluyendo 30 mM, en germinados de frijol Dalia, encontrando un incremento significativo en CFT tanto en el tratamiento control como en el elicitado, respecto al grano sin germinar, lo cual concuerda con el presente estudio; dichos autores reportan también el contenido de FT, encontrando un incremento en los tratamientos control y elicitado respecto al de la semilla sin germinar, sin embargo no encontraron diferencia significativa entre ellos, lo cual concuerda también con lo encontrado en el presente estudio. Świeca (2016) evaluó el efecto de la aplicación de dos concentraciones de H_2O_2 (50 y 200 mM) en la germinación de quínoa sobre el contenido de CFT y FT, sin encontrar una diferencia

significativa entre ambos tratamientos, sin embargo al compararlo con su tratamiento control, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los germinados elicitados y el control en el contenido de CFT, siendo similares ($p > 0.05$) en el contenido de FT.

C. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA SEMILLA DE GARBANZO CON H_2O_2 EN EL PERFIL DE ISOFLAVONAS

Se realizó la identificación de isoflavonas presentes en los extractos de garbanzo blanco sin germinar, germinado en condiciones óptimas y sin aplicación de H_2O_2 (control), sus respectivos cromatogramas se muestran en la **Figura 16**.

El análisis de UPLC-DAD-MS mostró la presencia de 10 picos los cuales fueron identificados tomando en cuenta su $UV_{m\acute{a}x}$, orden de elución y su patrón de fragmentación en modo positivo y negativo (**Cuadro 15**).

El pico 1 presentó un espectro $UV_{m\acute{a}x}$ de 271 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 271.16$ y $[M+H]^+$ con $m/z = 273.06$, y fue identificado tentativamente como garbanzol. Wu y col (2012) reportan la presencia de este compuesto en germinados de garbanzo, registrando que es una de las primeras isoflavonas en eluir ($t_R = 29.22$ min) y datos espectrométricos similares a los del pico 1. Esta señal cromatográfica se encontró presente sólo en los extractos de la muestra control y del germinado óptimo, esto puede deberse a que este compuesto es sintetizado en los primeros pasos de la ruta de fenilpropanoides presente en leguminosas; al inicio de la germinación, esta ruta se activa y transforma la liquiritigenina en garbanzol mediante la hidroxilación en la posición 3 del anillo C de la molécula

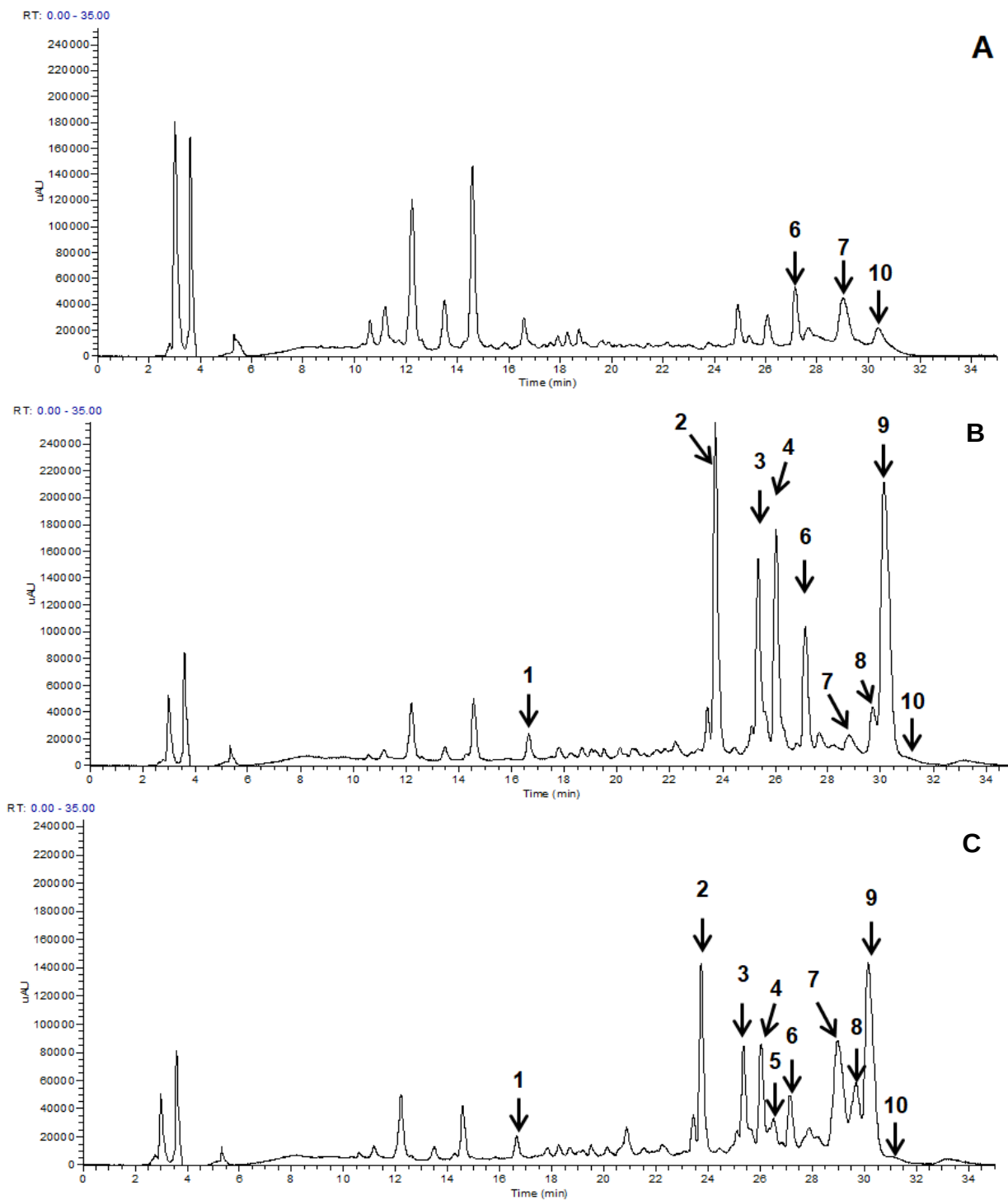


Figura 16. Cromatogramas de UPLC de las principales isoflavonas de extractos de garbanzo blanco Sinaloa-92 (A) sin germinar, (B) germinado óptimo, y (C) germinado control. La identidad tentativa de los picos se muestra en el **Cuadro 15**.

Cuadro 15. Identificación tentativa de isoflavonas en extractos de garbanzo blanco sin germinar, germinado óptimo y control.

Pico	TR (min)	UV _{máx.} (nm)	[M-H]-	[M+H] ⁺	Identidad tentativa	Referencia
1	16.55	271	271.16	273.06	Garbanzol	Wu y col 2012
2	23.69	251	429.19, 267.16, 251.98	431.08, 269.17, 254.21	Formononetín glucósido	Wu y col 2012; PubChem CID:5280378
3	25.31	249	515.41, 267.07, 252	517.15, 269.15, 254.19	Formononetín glucósido malonilado	Wu y col 2012 PubChem CID: 44257221
4	26.07	260	283.1, 268.04	447.13, 285.17	Biocanina A glucósido	Milán-Noris 2017; Wu y col 2012
5	26.49	249	283.13	285.07, 270.30, 253.03, 225.16	Calicosina	Wu y col 2012; PubChem CID:5280448
6	27.11	259	268.03, 283.09	270.33, 285.3	Prunetina	Wu y col 2012; PubChem CID:5281804
7	28.65	260	283	285.09, 242.13	Biocanina A	Mekky y col 2015; Milán-Noris 2017; Wu y col 2012; PubChem CID: 5280373
8	29.52	250	281.01	283.09	Pseudobaptigenina	Wu y col 2012; PubChem CID: 5281805
9	29.96	251	267.12, 252.05	269.09, 254.10	Formononetina	Milán-Noris; PubChem CID:5280378
10	30.78	294	1067.57, 1049.41	1069.19	Soyasaponina βg II	Mekky y col 2015

catalizada por la flavonona 3-hidroxilasa (Wu y col 2012; Stahlhut y col 2015).

El pico 2 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 251 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 429.19$ y $[M+H]^+$ con $m/z = 269.17$ correspondiente a la aglicona de formononetina, así como fragmentos de $[M-H]^-$ con $m/z = 267.16$, 251.98, correspondiente a la pérdida de una hexosa $[M-162.03-H]^-$ y un grupo metilo $[M-15.18-H]^-$, respectivamente, y fragmentos $[M+H]^+$ con $m/z = 431.08$, 225.16 que representan la molécula completa con la posterior pérdida de la hexosa $[M-162.03-H]^-$ y CO_2 $[M-44-H]^-$, lo cual corresponde tentativamente al compuesto formononetina glucósido, el cual concuerda con lo reportado por Wu y col (2012) y en la base de datos PubChem CID:5280378. Al comparar los cromatogramas esta señal se encontró presente sólo en los extractos de la muestra control y del germinado óptimo.

El pico 3 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 249 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 515.41$ y $[M+H]^+$ con $m/z = 269.15$ correspondiente a la aglicona de formononetina, así como fragmentos de $[M-H]^-$ con $m/z = 267.07$, 252, que representan la pérdida de una hexosa y malonato $[M-162-86-H]^-$, respectivamente, y fragmentos $[M+H]^+$ con $m/z = 517.15$, 225.19 que representan la molécula completa y la pérdida de CO_2 $[M-43.96-H]^-$ correspondientes tentativamente al compuesto formononetina glucósido malonilado. Wu y col (2012) reportan la presencia de este compuesto en germinados de garbanzo, presentando fragmentos similares a lo encontrado en el presente análisis y al patrón reportado en la base de datos

PubChem CID: 44257221. Esta señal cromatográfica no se encontró en los extractos de la semilla sin germinar.

El pico 4 presentó un espectro UV_{máx} de 260 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 283.1$ y $[M+H]^+$ con $m/z = 285.17$ así como un fragmento de $[M-H]^-$ con $m/z = 268.04$ que representa la pérdida de un grupo metilo $[M-15.06-H]^-$ de la aglicona biocanina A y un fragmento de $[M+H]^+$ con $m/z = 447.13$ que representa la molécula completa correspondiente tentativamente al compuesto biocanina A glucósido. Milán-Noris (2017) y Wu y col (2012) reportan la presencia de este compuesto en germinados de garbanzo, así como sus patrones de fragmentación los cuales concuerdan con lo encontrado en el presente análisis. Comparando los cromatogramas se observó la presencia de esta señal tanto en los extractos de la muestra control como en el germinado óptimo.

El pico 5 presentó un espectro UV_{máx} de 249 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z = 283.13$ y $[M+H]^+$ con $m/z = 285.07$ así como fragmentos de $[M+H]^+$ con $m/z = 270.30$ y 253.03 que representan la pérdida de un grupo metilo $[M+14.77+H]^+$ y un hidroxilo $[M+17.27+H]$ correspondientes tentativamente al compuesto calicosina. Wu y col (2012) reportan la presencia de este compuesto en germinados de garbanzo, presentando un peso molecular de 284 Da, el cual concuerda con los fragmentos encontrados en el presente análisis. Se comparó también el patrón de fragmentación con el reportado en la base de datos PubChem CID: 5280448, que permitió mayor certeza en la identidad del compuesto. Esta señal cromatográfica se encontró presente solo en el extracto de la muestra control, es decir, en el garbanzo germinado sin la aplicación de H₂O₂.

El pico 6 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 259 nm y un ion $[M-H]^-$ con $m/z= 283.09$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 285.3$ así como fragmentos de $[M-H]^-$ con $m/z= 268.03$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 270.33$ que ambos representan la pérdida de un grupo metilo $[M-15-H]^-$ correspondientes tentativamente al compuesto prunetina. Dichas características concuerdan con lo reportado por Wu y col (2012) y en la base de datos PubChem CID: 5281804. Esta señal cromatográfica se encontró presente en los extractos de las tres muestras analizadas.

El pico 7 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 260 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z= 283$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 285.09$ correspondientes tentativamente al compuesto biocanina A, lo que concuerda con Wu y col (2012), Mekky y col (2015), Milán-Noris (2017) y con el espectro reportado en la base de datos PubChem CID: 5280373. Esta señal cromatográfica se encontró presente en los extractos de las tres muestras analizadas.

El pico 8 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 250 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z= 281.01$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 283.09$ correspondientes tentativamente al compuesto pseudobaptigenina. Wu y col (2012) reportan la presencia de este compuesto en germinados de garbanzo presentando fragmentos similares a los encontrados en el presente análisis, además se comparó con el espectro reportado en la base de datos PubChem CID: 5281805. Este compuesto se encontró presente en los extractos de las muestras control y óptimo.

El pico 9 presentó un espectro $UV_{\text{máx}}$ de 251 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z= 267.12$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 269.09$ así como fragmentos de $[M-H]^-$ con $m/z=$

252.05 y $[M+H]^+$ con $m/z= 254.10$ que representa la pérdida de un metilo $[M-15-H]^-$ correspondientes tentativamente al compuesto formononetina lo que concuerda con lo reportado por Milán-Noris (2017) y con el espectro reportado en la base de datos PubChem CID: 5280378. La presencia de esta señal cromatográfica se encontró tanto en los extractos de la muestra control como en el germinado óptimo.

El pico 10 presentó un espectro $UV_{m\acute{a}x}$ de 294 nm y un ion molecular $[M-H]^-$ con $m/z= 1067.57$ y $[M+H]^+$ con $m/z= 1069.19$, correspondientes tentativamente al compuesto soyasaponina βg II reportado por Mekky y col (2015). Esta señal cromatográfica se encontró presente en los extractos de las tres muestras analizadas.

En el extracto de la semilla de garbanzo sin germinar sólo se logró identificar tentativamente la presencia de tres compuestos (prunetina, biocanina A y soyasaponina βg II). En el extracto control se observa claramente el efecto de la germinación sobre el perfil de isoflavonas, ya que se logró identificar tentativamente la presencia de 10 compuestos, de los cuales, 9 son isoflavonas. En el extracto óptimo se identificaron 9 compuestos, de los cuales 8 son isoflavonas. A pesar de que el perfil de compuestos entre el extracto óptimo y control es similar, las áreas bajo la curva de dichas señales difieren, lo que puede traducirse en una diferencia en la concentración de estos compuestos.

1. Cuantificación de isoflavonas

Se realizó la cuantificación de isoflavonas presentes en los extractos de garbanzo blanco sin germinar, germinado en condiciones óptimas y sin aplicación de H_2O_2

(control), observándose claramente los cambios en la producción de isoflavonas por efecto de la germinación (**Figura 17**), con un aumento de aproximadamente 25 veces (854.26 $\mu\text{g/g}$ de muestra b.s. en semillas sin germinar a 22113.33 $\mu\text{g/g}$ de muestra b.s. en el germinado control). Comparando el germinado control con el germinado óptimo se encontró un aumento del 16.67% en las isoflavonas totales (22113.33 $\mu\text{g/g}$ de muestra b.s. en el control a 25798.86 $\mu\text{g/g}$ de muestra b.s. en el óptimo).

Wu y col (2012) reportan un efecto similar a lo observado en el presente estudio obteniendo un incremento del contenido de flavonoides totales de aproximadamente 90 veces (83 $\mu\text{g/g}$ de muestra fresca en semillas sin germinar a 7568 $\mu\text{g/g}$ de muestra fresca en semillas germinadas) en garbanzo germinado 96 h, efecto atribuido a la activación de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides al iniciar el proceso de germinación.

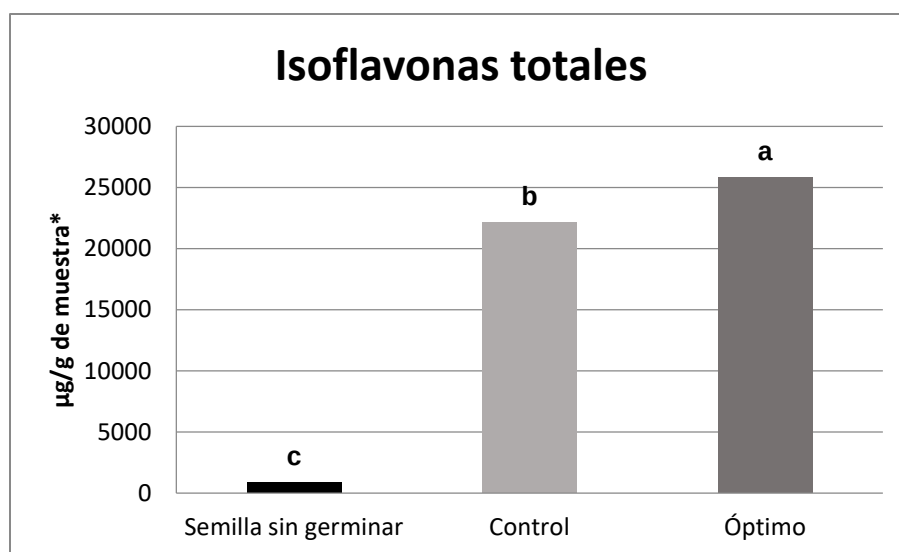


Figura 17. Contenido de isoflavonas totales en garbanzo. *µg equivalentes de formononetina/ g de muestra b.s.

IX. CONCLUSIONES

La aplicación de concentraciones bajas de H_2O_2 (5mM) durante la fase de imbibición mejora la capacidad germinativa de las semillas de garbanzo, incrementando el porcentaje e índice de germinación, y además promueve el crecimiento de la radícula.

La elicitación con H_2O_2 30mM con un tiempo de germinación de 72h permite maximizar el contenido de CFT y FT, así como la CaOx de germinados de garbanzo.

La germinación bajo condiciones óptimas (H_2O_2 30mM, 72h) incrementa el contenido de proteína con respecto al grano no germinado. Sin embargo, la aplicación de H_2O_2 causa una disminución significativa en el contenido de proteína con respecto al garbanzo germinado durante 72h sin la aplicación del elicitor.

La germinación bajo condiciones óptimas (H_2O_2 30mM, 72h) no modifica el contenido de CFT y FT, pero sí incrementa la CaOx con respecto al garbanzo germinado durante 72h sin la aplicación del elicitor.

La aplicación de peróxido no modifica el perfil de isoflavonas en garbanzo germinado durante 72h, sin embargo, incrementa el contenido de isoflavonas totales en un 16.67%.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Raymundo VG, Vélez-Ruiz JF. 2013. Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7 (2): 25-34.

Ammer SS, Chaurasia AK, Bara MB. 2018. Effect of different seed priming methods on germination and vigour of kabuli chickpea (*Cicer kabulium* L.) seeds. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(8): 1396-1404.

AOAC. 1999. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Analyst Chemists. Gaithersburg, MD, USA. Cap. 4, pp. 25; cap.12, pp. 7; cap.32, pp. 1-2; cap. 45, pp. 59-60.

Ateca NS, Pascualidades A, Carreras J. 2009. Anatomía vascular de plántulas de *Cicer arietinum* genotipo M x WR-315-14 (Fabaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 44 (1-2): 43 - 48.

Baenas N, Villaño D, García-Viguera C, Moreno DA. 2014. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. Molecules. 19: 13541-13563.

Barba-Espín G, Hernández JA, Diaz-Vivancos P. 2012. Role of H₂O₂ in pea seed germination. Plant Signaling and Behavior 7(2): 193–195.

Baskin CC, Baskin JM. 2014. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Second Edition. San Diego: Academic Press.

Cheyrier V. 2012. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*. 11 (2/3): 153-177.

Chinma CE, Anuonye JC, Simon OC, Ohiare RO, Danbaba N. 2015. Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. *Food Chemistry* 185: 454–458.

D'Mello P, Gadhwal M, Joshi U, Shetgiri P. 2011. Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 33–40.

Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 31(1): 74-85.

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

Fares C, Menga V. 2014. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Fortification of cereal-based foods to increase fiber and phytochemical content. En: Watson RR, Preedy RV, Zibadi S. *Wheat and rice in disease prevention and health*. San Diego CA: Elsevier. p 533- 546.

Farooq M, Basra SMA, Rehman H, Mehmood T. 2006. Germination and early seedling growth as affected by pre-sowing ethanol seed treatments in fine rice. *International Journal Agriculture and Biology* 8(1): 19-22.

Ganugapati J, Mukkavalli S, Sahithi A. 2011. Docking studies of green tea flavonoids as insulin mimetics. *International Journal of Computer Applications*. 30: 48–52.

García-Armenta E. 2015. Estudio morfométrico del patrón de ruptura de alimentos. [Tesis doctoral]. Programa de Doctorado en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional.

Ghezzi P, Bonetto V. 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3:1145–1153.

Ghiassi TB, Gharachorloo M, Baharinia M, Alireza MS. 2012. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4): 1137-1143.

Gikas E, Alesta A, Economou E, Karamanos A, Tsarbopoulos A. 2008. Determination of isoflavones in the aerial part of red clover by HPLC–Diode array detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31: 1181–1194.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

González-Cruz L, Filardo-Kerstupp S, Juárez-Goiz JMS, Güemes-Vera N, Bernardino-Nicanor A. 2014. Características nutricionales del garbanzo. En: Los

alimentos en México y su relación con la salud. México: Editorial Plaza y Valdés Editores. p.135-147.

González-Zertuche L, Orozco-Segovia A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*, Boletín de la Sociedad Botánica de México 58:15-30.

Guardado-Félix D, Serna-Saldivar SO, Cuevas-Rodríguez EO, Jacobo-Velázquez DA, Gutiérrez-Uribe JA. 2017. Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. Food Chemistry 226: 69–74.

Gupta RK, Gupta K, Sharma A, Das M, Ansari IA, Dwivedi PD. 2017. Health risks and benefits of chickpea (*Cicer arietinum*) consumption. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65: 6–22.

Heimler D, Vignolini P, Dini GM, Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 3053-3056.

Heiras-Palazuelos MJ, Ochoa-Lugo MI, Gutiérrez-Dorado R, López-Valenzuela JA, Mora-Rochín S, Milán-Carrillo J, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2012. 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.

Herrera J, Alizaga R, Guevara E, Jiménez V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. 1 ed. Editorial Universidad de Costa Rica.18-24.

Hsieh HC, Kao TH, Chen B H. 2004. A fast HPLC method for analysis of isoflavons in soybean. Journal of liquid chromatography and related technologies 27(2): 315-324.

Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. Journal of Food Science. 42(5):1269-1273.

[INIFAP] Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2017. Garbanzo de riego. En: Agenda técnica agrícola de Sinaloa. México. INIFAP. p. 48-59.

[INIFAP] Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2004. El cultivo de garbanzo blanco en sonora. Hermosillo, Sonora: INIFAP. 290p.

Jakhar S, Jakhar S. 2015. Effect of pre-treatment of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds on seed germination and seedling growth under salt stress. International Journal of Advanced Research. 3(11): 303 – 311.

Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CLL, Chibbar RN. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition. 108: 11–26.

Kärkönen A, Kuchitsu K. 2015. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. Phytochemistry 112: 22–32.

Kermode AR. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plants Science*. 9:155-195.

Khan R, Khan IA. 2015. Varietal response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) towards the allelopathy of different weeds. *Sains Malaysiana*. 44(1): 25–30.

Khattak AB, Zeb A, Bibi N. 2008. Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and in vitro protein digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry* 109: 797-801.

Khattak AB, Zeb A, Khan M, Bibi N, Khattak MS. 2007. Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry* 104(3): 1074-1079.

Khuri AL, Cornell JA. 1987. Response surfaces: designs and analyses. New York: Marcel Dekker Inc. 405 p.

Kyohei K, Shinsuke K, Masatsugu S, Nozomi A, Gaku W, Takashi Y, Iwaya-Inoue M, Ishibashi Y. 2016. Role of reactive oxygen species produced by NADPH oxidase in gibberellin biosynthesis during barley seed germination. *Plant Signaling & Behavior*. 11(5):e1180492.

Lariguet P, Ranocha P, De Meyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C. 2013. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta*. 238(2): 381-95.

Li WY, Chen BX, Chen ZJ, Gao YT, Chen Z, Liu J. 2017. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidases promote radicle protrusion and root

elongation during rice seed germination. International Journal of Molecular Sciences 18(1): 110.

Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J. 2010. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. Journal of Experimental Botany. 61(11): 2979–2990.

Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C, Franconi MC. 2007. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica Bioquímica y Patología Clínica. Asociación Bioquímica Argentina. 71(1): 54-66.

Ma HR, Wang J, Qi HX, Gao YH, Pang LJ, Yang Y, Wang ZH, Duan MJ, Chen H, Cao X, Aisa HA. 2013. Assessment of the estrogenic activities of chickpea (*Cicer arietinum* L) sprout isoflavone extract in ovariectomized rats. Acta Pharmacologica Sinica 34: 380–386.

Mekky HR, Contreras MM, El-Gindi MR, Abdel-Monem AR, Abdel-Sattar E, Segura-Carretero A. 2015. Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. The Royal Society of Chemistry 5:17751-17767.

Mendoza MDL, Roa MC, Ahumada BC. 2015. Efecto de las isoflavonas de la soja en la salud ósea de adultos y niños. Salud Uninorte. 31 (1): 138-152.

Mendoza-Sánchez M, Guevara-González RG, Castaño-Tostado E, Mercado-Silva EM, Acosta-Gallegos JA, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R. 2016. Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an

alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. Food Chemistry. 212: 128–137.

Milán-Noris AK. 2017. Nutraceutical properties of isolated starch, phytochemical compounds and bioactive peptides from pigmented chickpea cultivars influenced by cooking or germination process [Tesis doctoral]. Monterrey, NL: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. 101 p.

Møller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology 58:459–481.

Myers RH, Montgomery DC, Vining GG. 2002. Generalized linear models: With applications in engineering and the sciences. Nueva York: John Wiley and Sons Press. 342 p.

Nollet LML, Gutiérrez-Urbe JA. 2018. Phenolic Compounds in food: characterization and Analysis. Food Analysis & Properties. CRC Press. 430p.

Ortega MPF, Manjarrez SP, Fierros LGA, Salinas PRA, Padilla VI, Gutiérrez PE, Castillo TN. 2013. BLANORO, nueva variedad de Garbanzo Blanco para exportación. México: INIFAP-SAGARPA. Folleto Técnico No. 45.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science. 5(47): 1-15.

Pavón NP, Ballato-Santos J, Pérez-Pérez C. 2011. Germinación y establecimiento de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Fabaceae-Mimosoideae). Revista mexicana de biodiversidad 82(2): 653-661.

Perales-Sánchez JXK, Reyes-Moreno C, Gómez-Favela MA, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Valdez-Ortiz A, Gutiérrez-Dorado R. 2014. Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by optimizing the germination conditions of amaranth seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 69: 196-202.

Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. 2011. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry* 129: 35–44.

Quintero-Soto MF, Saracho-Peña AG, Chavez-Ontiveros J, Garzon-Tiznado JA, Pineda-Hidalgo KV, Delgado-Vargas F, 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.

Rachwa-Rosiak D, Nebesny E, Budryn G. 2015. Chickpeas—Composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(8): 1137-1145.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Panala A, Yang M y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9/10): 1231-1237.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 23(4): 519–534.

Romero GDM. 2018. Análisis del efecto de elicitores en la expresión de genes relacionados con la germinación de chile chiltepín (*Capsicum annuum* variedad *glabriusculum*) [Tesis de licenciatura]. Culiacán, Sin: Universidad Autónoma de Sinaloa. 111 p.

Rosental L, Perelman A, Nevo N, Toubiana D, Samani T, Batushansky A, Sikron N, Saranga Y, Fait A. 2016. Environmental and genetic effects on tomato seed metabolic balance and its association with germination vigor. *BioMed Central Genomics*. 17:1047.

Saleh HM, Hassan AA, Mansour EH, Fahmy HA, El-Bedawey AEA. 2017. Melatonin, phenolics content and antioxidant activity of germinated selected legumes and their fractions. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2017.09.001>

Sarkar D, Shetty K. 2014. Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annual review of food science and technology* 5: 395-413.

Sheng R, Lin X, Zhang J, SunChol K, Huang W, Yang B, He Q, Hu Y. 2009. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17: 6692–6698.

Shoba G, Hari S, Prabhavathi G, Stella S. 2010. Flavonoids – natural therapeutic agents for polycystic kidney disease. *International Journal of Pharma Bio Sciences*. 1: B89–B105.

[SIAP] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. El garbanzo grano: alimento con mucha riqueza nutrimental y producción en constante crecimiento. México. Disponible en: www.gob.mx. Consultado el 09 de julio de 2018.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela RRM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.

Snijman PW, Swanevelder S, Joubert E, Green IR, Gelderblom WC. 2007. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose–response effects on mutagen activation–flavonoid interactions. *Mutation Research*. 631: 111–123.

Stahlhut SG, Siedler S, Malla S, Harrison SJ, Maury J, Neves AR, Forster J. 2015. Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichiacoli*. *Metabolic Engineering*. 31: 84-93.

Swieca M, y Baraniak B. 2013. Influence of elicitation with H₂O₂ on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(3): 489–496.

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

Swieca M. 2016. Hydrogen peroxide treatment and the phenylpropanoid pathway precursors feeding improve phenolics and antioxidant capacity of quinoa

sprouts via an induction of L-Tyrosine and L-Phenylalanine ammonia-lyases activities. Journal of Chemistry. (2016): Article ID 1936516, 7 p.

Tinus T, Damour M, van Riel V, Sopade PA. 2012. Particle size-starch-protein digestibility relationships in cowpea (*Vigna unguiculata*). Journal of Food Engineering. 113: 254-264.

Wahid A, Mubarak P, Gelania S, Shahzad MAB. 2007. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. Journal of Plant Physiology 164: 283-294.

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. Journal of Experimental Botany. 62 (10): 3289–3309.

Wojtyla L, Lechowska K, Kubala S, Garneczarska M. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. Frontiers in Plant Science 7:66.

Wu Z, Song L, Feng S, Liu Y, He G, Yioe Y, Liu LS, Huang D. 2012. Germination dramatically increases isoflavonoid content and diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(35): 8606-8615.

Wu-Yang H, Yi-Zhong C, Yanbo Z. 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutrition and Cancer. 62(1): 1-20.

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
ABTS	2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6- ácido sulfónico
AOAC	Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (del inglés Association of Official Agricultural Chemists)
cm	Centímetro
p.ej.	Por ejemplo
g	Gramo
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución (del inglés ultra performance liquid chromatography)
L	Litro
M	Mol
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normalidad
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
p/v	Peso/volumen

ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromol