



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN
ALIMENTOS**

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

“Identificación del perfil enzimático utilizado por la microbiota humana intestinal para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas”

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Liliana Maribel Perez Perez

Hermosillo, Sonora

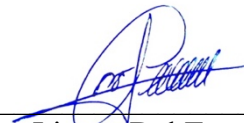
Junio 2021

APROBACIÓN

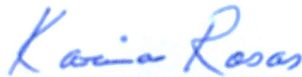
“Identificación del perfil enzimático utilizado por la microbiota humana intestinal para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas”



M.C. Liliana Maribel Perez Perez



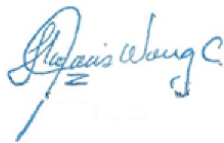
Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez
Directora de tesis



Dra. Ema Carina Rosas Burgos
Secretario



Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Sinodal



Dr. Francisco Javier Wong Corral
Sinodal



Dr. Saúl Ruiz Cruz
Sinodal

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al jefe del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente



M.C. Liliana Maribel Perez Perez

Autor

Dra. Carmen María López Saiz
Coordinadora del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Junio 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme terminar este sueño. También agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por aceptarme para realizar mis estudios de posgrado.

A mi mamá por incentivar me a seguir cuando ya sentía que no podía, tú eras la que con tus palabras me recordabas porque estaba tan lejos de casa, por darme los mejores consejos y darme todo el amor que se puede y más, gracias mami.

A mi papá que siempre me apoyó y me impulsó para seguir mas adelante, para mi eres y serás el mejor investigador del mundo, desde los 8 años decidí que yo también quería hacer un doctorado como tú y por fin estoy muy cerca de lograrlo.

A mis dos hermanas Mariana y Susy que, aunque nunca supieron bien que hacía siempre me apoyaban y se enorgullecían de mí.

A mi novio eterno Laurent vielen dank für all deine Unterstützung, te amo novio-esposo.

A mi segunda mamá la Dra Liz, que siempre ha estado ahí siempre para apoyarme en cualquier cosa que eh necesitado, académica y personalmente muchas gracias Dra, no tengo palabras para expresarle lo mucho que la quiero y lo agradecida que estoy con usted, sin usted este sueño no sería lo mismo, muchas gracias por permitirme sentirme parte de su familia y este agradecimiento también va para el Doctor Quique gracias por siempre ayudarme, y a mis dos corazones Karen y Made que el solo verlas me hace sonreír.

Al Dr Wong le agradezco infinitamente el apoyo brindado para cualquier congreso o cuestión académica siempre estuvo ahí, y también para todos los estudiantes, muchas gracias jefe por siempre preocuparse por nosotros los estudiantes.

Al Dr Huerta por enseñarme tantas cosas del laboratorio y también enseñarme lo que no se debe hacer jaja, disfruté mucho estar en su laboratorio, aprendí mucho, gracias por la oportunidad ¡¡Señor si Señor!!

Al Dr Saúl por adoptarme en su laboratorio y poder ir a cada rato y moverle a sus equipos y a veces sin avisar jeje, por aguantar mis bromas, y las lecciones aprendidas, fue muy divertido trabajar con usted y su equipo de trabajo, muchas gracias Doc sabe que lo estimo mucho.

A la Dra Ema Carina por todos sus comentarios que me ayudaron para mejorar el trabajo y todos sus consejos, muchas gracias Dra.

A mis amigas: Daniela (mil gracias dany, tú fuiste parte clave para que me decidiera a entrar al dipa jajaja, muchas gracias por siempre animarme). Fátima (por contagiarme de su siempre buena vibra). Rachel (gracias por ser mi amiga, por ayudarme en todo momento, por seguirme la corriente en todo, te quiero mucho Rachel, tú sabes que yo siempre sigo tus consejos). Mariela (además de ser mi roomie, gracias chule por los consejos brindados, por sacarme la carcajada muchas veces por desvelarte conmigo, por reír y llorar conmigo durante todo este proceso, por andar conmigo en todos lados hasta en el hospital, muchas gracias chule, gracias por tu amistad) y aquí mismo incluyo al Chan que en muy poco tiempo pasamos a ser grandes amigos, gracias por las locuras!!

A mi equipo de trabajo Ivan, Leslie, Karen, Fernanda, Aline por ser el quipo Los Toritos, por siempre apoyarme y ayudarme en todo, por las desveladas en los laboratorios y por los buenos consejos que me han hecho crecer.

A mis roomies Andrés y Alma que compartieron conmigo momentos muy difíciles en mi vida, y por la mejor pareja rommie jajaja gracias por aguantarme tanto, los quiero mucho palomilla!!

Finalmente, a todos mis amigos de los posgrados de ciencias de la salud, física, ingeniería química, psicología, y Unison campus Caborca, que siempre me apoyaban con los equipos cuando necesitaba, gracias Isaac, Hery, Alex, Mario, Wence, Polly, Jael, Shava, Humberto, Luisa, Nathaly, Efrain, Max, Esmeralda, Maestra Edna, Alberto, Brianda.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	16
ANTECEDENTES	19
Generalidades del garbanzo.....	19
Compuestos fenólicos.....	22
Compuestos fenólicos en atmósferas modificadas.....	28
Capacidad antioxidante.....	29
Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad de compuestos fenólicos.....	31
Interacción de la microbiota intestinal humana con los compuestos fenólicos....	32
Liberación de compuestos fenólicos por enzimas	34
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	37
Objetivo General.....	37
Objetivos Específicos.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Obtención de la muestra.....	42
Preparación de la muestra.....	42
Almacenamientos en atmosferas modificadas.....	42
Caracterización físicoquímica del garbanzo (análisis proximal)	43
Determinación de parámetros de calidad tecnológica: abroción del agua textura (dureza) y color.....	43
Absorción de agua.....	43
Determinación de textura (dureza).....	44
Determinación de color	44
Extracción de compuestos fenólicos en el garbanzo.....	44
Libres.....	44
Conjugados.....	45
Ligados.....	45
Cuantificación de Fenoles Totales.....	45
Medición de la capacidad antioxidante.....	46
Método DPPH.....	46
Método ABTS.....	46
Método FRAP.....	47

Evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos.....	47
Identificación de compuestos fenólicos por medio de UPLC-MS.....	48
Determinación de bioaccesibilidad y digestibilidad de los compuestos fenólicos del garbanzo en un modelo gastrointestinal <i>in vitro</i>	49
Sistema de simulación <i>in vitro</i> del sistema gastrointestinal.....	49
Preparación de la harina de garbanzo.....	50
Obtención de la microbiota y pool de bacterias presentes en las heces fecales humanas.....	50
Interacción microbiota intestinal humana y pool de bacterias con compuestos fenólicos ligados.....	51
Identificación de las enzimas presentes en la interacción de la microbiota intestinal humana y el pool de bacterias con harina de garbanzo.....	51
Preparación de la muestra para la identificación de enzimas.....	51
Identificación de proteínas mediante análisis proteómico tipo shotgun.....	53
Análisis estadístico.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Caracterización fisicoquímica del garbanzo (análisis proximal).....	56
Almacenamiento en atmósferas modificadas (ATM).....	59
Calidad tecnológica.....	64
Capacidad antioxidante de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	66
Identificación por UPLC-MS de compuestos fenólicos en los extractos de garbanzo liberados a través del sistema gastroinstetinal <i>in vitro</i>	69
Interacción de microbiota intestinal humana y compuestos fenólicos ligados del garbanzo.....	74
Identificación de proteínas mediante análisis proteómico tipo shotgun	81
CONCLUSIONES	87
ANEXOS	88
REFERENCIAS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	22
2	Enlaces de compuestos fenólicos libres en la matriz celular.....	24
3	Compuestos fenólicos ligados a la matriz celular del garbanzo.....	25
4	Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.....	32
5	Esquema general de la metodología.....	38
6	Esquema objetivo particular 1.....	39
7	Esquema objetivo particular 2.....	39
8	Esquema objetivo particular 3.....	40
9	Esquema objetivo particular 4.....	40
10	Esquema objetivo particular 5.....	41
11	Inhibición del radical DPPH de garbanzo sometido a diferentes atmósferas hasta 50 días de almacenamiento.....	61
12	Inhibición del radical ABTS de garbanzo sometido a diferentes atmósferas hasta 50 díasde almacenamiento.....	62
13	Cuantificación de compuestos fenólicos de garbanzo sometidos a diferentes atmósferas hasta 50 días de almacenamiento.....	63
14	Textura del garbanzo expresada en Newtons y absorción de agua del garbanzo.....	64
15	Determinación de capacidad antioxidante con los radicales y método: a) DPPH, b) ABTS, c) AAPH, d) FRAP en la interacción de microbiota intestinal humana (MC) con el garbanzo y la interacción de aislado de bacterias (AB) con el garbanzo.....	78
16	Cuantificación de Fenoles Totales de la interacción de microbiota intestinal (MC) y aislado de bacterias (AB) con el garbanzo.....	79
17	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.....	81
18	Cromatogramas de extractos de garbanzo crudo y cocido.....	93
19	Cromatogramas de extractos digestión <i>in vitro</i> boca.....	94
20	Cromatogramas de extractos digestión <i>in vitro</i> estómago.....	94
21	Cromatogramas de extractos digestión <i>in vitro</i> intestino	94
22	Cromatogramas de muestra C a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 h de fermentación.....	95
23	Cromatogramas de muestra B a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 h de fermentación.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Contenido de compuestos fenólicos totales, libres y ligados en garbanzo..	26
2	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en garbanzo.....	27
3	Clasificación y preparación de las muestras con la microbiota total y bacterias aisladas.....	51
4	Composición proximal de garbanzo crudo y cocido.....	56
5	Composición proximal de garbanzo crudo y cocido en diferentes variedades de diversos autores.....	58
6	Análisis químico proximal de harina de garbanzo en día 0 y día 50 en una atmósfera de N ₂ a -20 °C.....	60
7	Parámetros de color del garbanzo Blanoro.....	65
8	Capacidad antioxidante y cuantificación de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión <i>in vitro</i>	68
9	Compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados , identificados por UPLC-MS en garbanzo crudo y cocido.....	70
10	Compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados , identificados por UPLC-MS en el sistema de digestión <i>in vitro</i>	73
11	Identificación de género de bacterias en muestra fecal humana.....	74
12	Identificación de compuestos fenólicos procedentes de la interacción de microbiota intestinal humana con compuestos fenólicos ligados del garbanzo (muestra C).....	76
13	Identificación de compuestos fenólicos procedentes de la interacción del consorcio de bacterias aisladas de heces humanas con compuestos fenólicos ligados del garbanzo (muestra B).....	77
14	Enzimas identificadas en la muestra A (bacterias aisladas) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos.....	84
15	Enzimas identificadas en la muestra B (bacterias aisladas + garbanzo) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos	85
16	Enzimas identificadas en la muestra C (microbiota intestinal humana + garbanzo) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos.....	86
17	Coefficientes de correlación de Pearson de compuestos fenólicos contra extractos de garbanzo crudo y cocido, con diferentes técnicas antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, AAPH).....	91
18	Coefficientes de correlación de Pearson de compuestos fenólicos contra muestras C y B con diferentes técnicas antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, AAPH).....	92
19	Identificación de proteínas en el filtrado de la muestra A	97
20	Identificación de proteínas en el pellet de la muestra A	97
21	Identificación de proteínas en el filtrado de la muestra B.....	97
22	Identificación de proteínas en el pellet de la muestra B	98
23	Identificación de proteínas en el pellet de la muestra C	99
24	Proteínas de garbanzo identificadas en las muestras B y C.	99

RESUMEN

El garbanzo, además de aportar nutrientes, también contiene compuestos fenólicos considerados antioxidantes, que se encuentran libres, conjugados y ligados. Estos últimos están en mayor cantidad (Aprox. 80%) y como solo pueden liberarse por enzimas de la microbiota intestinal humana en el intestino grueso, su absorción es casi nula desaprovechando sus propiedades bioactivas. Por otra parte, una desventaja de los compuestos fenólicos, es que pueden ser susceptibles a la degradación durante el almacenamiento disminuyendo paulatinamente la capacidad antioxidante. Por lo tanto, en este trabajo se pretende identificar el perfil enzimático utilizado por la microbiota intestinal humana para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas. Se utilizó garbanzo variedad Blanoro tipo Kabuli. Se determinó la prueba de remojo, la composición proximal del garbanzo crudo y cocido, así como también parámetros de calidad tecnológica como color y textura. Para alargar la vida de anaquel de los compuestos fenólicos se utilizó la técnica de conservación en atmósferas modificadas empacando el garbanzo cocido con N₂ y CO₂, almacenado a diferentes temperaturas (-20, 4, 25, y 50 °C) y con diferentes tiempos de exposición (0, 25 y 50 días), a los cuales se cuantificaron los compuestos fenólicos por la técnica de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por ABTS, DPPH, FRAP y prueba de hemólisis de eritrocitos. Los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados se identificaron por medio de UPLC-MS. Adicionalmente se realizó un estudio de digestión *in vitro* del garbanzo cocido. Finalmente, para la determinación del perfil enzimático de la microbiota intestinal tras 12 h de fermentación se utilizó un análisis proteómico tipo shotgun. Dentro de los resultados obtenidos se observó que el garbanzo tiene carbohidratos (68%), cenizas (1.7%), proteínas (17%), grasas (5%) y fibra (7.3%). El grano alcanzó el 50% de absorción de agua a las 8 h con una textura de 0.7 N presentando un color más amarillento el garbanzo cocido respecto al crudo. Los compuestos fenólicos ligados en el garbanzo se encontraron en mayor proporción (79%). La capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos del garbanzo cocido permanecieron estables a bajas temperaturas (4 y -20 °C) bajo atmósfera con N₂ durante 50 días. Enterodiol fue el compuesto fenólico mayoritario identificado. Los compuestos fenólicos libres y conjugados presentaron mayor bioaccesibilidad en el modelo

gastrointestinal *In vitro*. La microbiota intestinal humana liberó los compuestos fenólicos ligados del garbanzo en mayor cantidad a las 12 y 24 h de fermentación. El análisis proteómico permitió identificar cientos de proteínas de la microbiota intestinal tras 12 h de fermentación, entre ellas enzimas relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos ligados del garbanzo como las pectin-esterasas. Por lo tanto, estas enzimas podrían ser utilizadas para liberar compuestos fenólicos de otras matrices alimentarias aprovechando al máximo sus propiedades antioxidantes, ya sea para el área farmacéutica o alimentaria.

ABSTRACT

Chickpea, in addition to providing nutrients, also contains phenolic compounds considered antioxidants, which are free, conjugated and bound. These last compounds are found in greater quantity (Approx. 80%) and as they can only be released by enzymes of the human intestinal microbiota in the large intestine, their absorption is almost nil, wasting their bioactive properties. On the other hand, a disadvantage of phenolic compounds is that they can be susceptible to degradation during storage, gradually decreasing the antioxidant capacity. Therefore, this work aimed to identify the enzymatic profile used by the human intestinal microbiota for the bioaccessibility of bound phenolic compounds in cooked chickpea (*Cicer arietinum* L.) exposed to different modified atmospheres. Chickpea variety Blanoro type Kabuli was used. The soaking test, the proximal composition of the raw and cooked chickpea, as well as technological quality parameters such as color and texture were determined. Modified atmospheres were used to extend the shelf life of the phenolic compounds. Cooked chickpea was packed using N₂ and CO₂, stored at different temperatures (-20 °C, 4 °C, 25 °C, and 50 °C) for different times (0, 25 and 50 days) and phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu technique whereas the antioxidant activity was evaluated by ABTS, DPPH, FRAP and erythrocyte hemolysis test. Free, conjugated and bound phenolic compounds were identified by means of UPLC-MS. In addition, an *in vitro* digestion study of the cooked chickpea was carried out. Finally, to determine the enzymatic profile of the intestinal microbiota after 12 h of fermentation, a shotgun-type proteomic analysis was used. Among the results obtained, it was observed that chickpea has carbohydrates (68%), ashes (1.7%), proteins (17%), fats (5%) and fiber (7.3%). The grain reached 50% water absorption at 8 h with a texture of 0.7 N and a more yellowish color in cooked chickpea compared to raw. The phenolic compounds bound in chickpea were found in a higher proportion (79%). Phenolic compounds and the antioxidant capacity of cooked chickpea were stable at low temperatures (4 and -20 °C) under an atmosphere with N₂ for 50 days. The major phenolic compound identified was enterodiol. Free and conjugated phenolics presented higher bioaccessibility in the *in vitro* gastrointestinal model. Human gut microbiota releases the bound phenolic compounds from chickpea in greater quantities at 12 and 24 h of fermentation. Proteomic analysis allowed the identification of

hundreds of proteins from the intestinal microbiota after 12 h of fermentation, including enzymes related to the release of bound phenolic compounds such as pectin-esterases. Therefore, these enzymes could be used to release phenolic compounds from other food matrices, taking full advantage of their antioxidant properties, either for the pharmaceutical or food area.

INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales países productores de garbanzos del mundo (SIAP 2018). La calidad del garbanzo para su comercialización, como sus propiedades nutricionales (hidratos de carbono, proteínas, cenizas, grasas), el color y la textura, influye en el almacenamiento y la aceptación por parte del consumidor. Hay dos tipos de garbanzo, el Desi, destinado como forraje, y el Kabuli, destinado al consumo humano (Perez-Perez et al., 2018).

El consumo de la legumbre garbanzo Kabuli presenta beneficios para la salud humana debido a los factores nutricionales como una buena fuente de proteínas, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos (Herrera-Flores et al., 2014; Ferreira-Dietrich et al., 2019; He et al., 2019; Summo et al., 2019). Sin embargo, recientemente compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos han tomado un papel importante en los alimentos debido a las ventajas para prevenir enfermedades degenerativas derivadas de su capacidad antioxidante (Singh et al., 2017; Niño-Medina et al., 2017).

Por desgracia, este tipo de compuestos son susceptibles de degradarse debido a la presencia de oxígeno durante el almacenamiento. Una alternativa para ello es el uso de atmósferas controladas. Consiste en un método de almacenamiento en el que se regulan las concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno (Barbosa et al., 2016). Esta tecnología es una alternativa más natural, de bajo costo, cómoda de usar y respetuosa con el medio ambiente (Iturralde-García et al., 2016). La eficacia de las atmósferas controladas en los alimentos ha sido demostrada en varios estudios (Iturralde-García et al., 2016; Kumar et al., 2019; Shen et al., 2019). Sin embargo, son pocos los estudios realizados en legumbres, especialmente en garbanzos cocidos.

Adicionalmente, los compuestos fenólicos pueden estar en la matriz de los alimentos en tres formas diferentes: a) Los compuestos fenólicos libres unidos por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, o fuerzas electrostáticas (Quirós-Sauceda et al., 2012); b) Compuestos fenólicos conjugados unidos a proteínas y azúcares por enlaces débiles similares a los fenoles

libres (Acosta-Estrada et al., 2014); c) Compuestos fenólicos unidos covalentemente por enlaces éster o éter a la pared celular con componentes como la celulosa, la hemicelulosa, la lignina, la pectina y las proteínas estructurales (Acosta-Estrada et al., 2014). Sin embargo, la determinación de los compuestos fenólicos totales en las leguminosas en la mayoría de los estudios está subestimada porque, en el proceso de extracción para su cuantificación, generalmente se extraen los compuestos fenólicos libres y a veces los conjugados, mientras que los compuestos fenólicos ligados no son considerados (Ferreira-Dietrich et al., 2019; Singh et al., 2017). Por lo tanto, es importante tenerlos en cuenta porque los compuestos fenólicos ligados pueden encontrarse en mayor cantidad (Aprox. 70%) y en consecuencia podrían conferir una mayor actividad antioxidante (Domínguez-Arispuro et al., 2018; Sun et al., 2020). Pero, esto puede variar dependiendo del tipo o variedad de garbanzo (Kumar et al., 2019).

Para aprovechar los beneficios de la capacidad antioxidante del garbanzo, los compuestos fenólicos deben tener una alta bioaccesibilidad en el intestino delgado (Mercado-Mercado et al., 2020). La técnica de simulación de digestibilidad *in vitro* puede ayudar a determinar el tránsito de los compuestos fenólicos durante cada paso de la digestibilidad (boca, estómago e intestino delgado) y si los compuestos fenólicos pueden liberarse en cada paso. La alfa-amilasa (boca), la pepsina (estómago), la quimotripsina, la tripsina y la pancreatina (intestino delgado), son enzimas que se han utilizado en el sistema de digestión *in vitro* en muchos estudios (Koehnlein et al., 2016; Mtolo et al., 2017; Lucas-González et al., 2016; Lucas-González 2018; De Santiago et al., 2018). Estas enzimas pueden hidrolizar los enlaces covalentes del azúcar y las proteínas.

En consecuencia, esto podría conferir una mayor bioaccesibilidad a los diferentes tipos de compuestos fenólicos. Varios autores mencionan la biodisponibilidad y la bioaccesibilidad de los polifenoles mediante modelos *in vivo* (utilizando animales o humanos), *ex vivo* (órganos gastrointestinales de animales) e *in vitro* (membranas artificiales, cultivos celulares). La evaluación *in vitro* puede tener la ventaja de ajustar el pH y las condiciones y parámetros prefijados a una determinada concentración (Melini et al., 2020). Generalmente se utilizan técnicas antioxidantes como ABTS, DPPH, FRAP, y determinación de fenoles totales (Zhu et al., 2020; Lafarga et al., 2019; Koehnlein et al., 2016; Mtolo et al., 2017; Moser et al., 2018; Velickovic et al., 2018; Giusti et al., 2019).

Además de la liberación de compuestos fenólicos gracias a las enzimas digestivas, la microbiota intestinal humana puede aportar enzimas como las esterasas, que podrían liberar mejor a los compuestos fenólicos ligados. Actualmente en el garbanzo se desconoce el mecanismo de liberación de los fenoles ligados por la microbiota intestinal humana, además se desconoce la cantidad de fenoles ligados que se pueden liberar, así como también se desconoce el perfil enzimático que la microbiota utiliza para que se liberen este tipo de compuestos (Chen et al., 2012). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar el perfil enzimático utilizado por la microbiota intestinal humana para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas.

ANTECEDENTES

Generalidades del garbanzo

Existe evidencia de los beneficios a la salud debido al consumo de frutas, verduras, cereales y leguminosas. La importancia del consumo de estos productos, especialmente de las leguminosas, es la prevención de enfermedades cardiovasculares, enfermedades crónico-degenerativas, entre otras. El consumo de leguminosas puede disminuir el índice de colesterol y el índice glicémico alrededor de un 10 al 40% (Polak et al., 2015).

La familia de las leguminosas se divide en seis subfamilias: Caesalpinioideae DC, Cercidoideae, Detatioideae, Dialioideae, Duparquetioideae y Papolionoideae (Azani et al., 2017). Dentro de las especies más comunes en el mundo se encuentran: frijoles riñón, judías, habas, frijol cargamanto, frijoles negros, frijoles pintos, soja, frijol tépari, lentejas y garbanzos (Polak et al., 2015). El garbanzo siendo del grupo de las leguminosas tiene aporte en proteínas, vitaminas (tiamina, niacina, ácido ascórbico) y algunos minerales (Cu, Ca, P, Fe, Mg, K, Mn, Zn), también contiene componentes benéficos para la salud como: alcaloides, oligosacáridos, isoflavonas y compuestos fenólicos (Aguilar-Raymundo et al., 2013; Polak et al., 2015).

La planta del garbanzo tiene una altura de menos de un metro, generalmente asume el crecimiento erecto, semierecto y extendido. La ramificación empieza desde la base. La pubescencia en la planta aparece en raíces, tallo, hojas y vainas. Las glándulas que se encuentran en la superficie de la planta contienen ácidos málico, oxálico y cítrico, los cuales ayudan en la defensa contra plagas (Sajja et al., 2017).

La planta produce tres diferentes tipos de ramas:

- **Primaria:** conformadas por alrededor de 8 ramas de las cuales pueden surgir semillas, generalmente son gruesas, leñosas y pueden confundirse con el tallo principal.
- **Secundaria:** Estas ramas surgen de las ramas primarias y son delgadas, se encuentran llenas de hojas y flores.

- Terciaria: Existen genotipos donde suelen no estar presentes estas ramas.

La planta crece hasta una altura de hasta 100 cm en general y ocasionalmente alcanza 150 cm dependiendo de las condiciones de crecimiento (Sajja et al., 2017). El garbanzo tiene hojas compuestas las cuales están formadas de 5 a 7 folíolos. Los folíolos son en forma oval con los bordes serruchados. El sistema de raíces se caracteriza por tener una raíz pivotante lo cual le permite tener un sistema robusto que alcanza más de 3 metros lo que trae como consecuencia favorecer a la planta a sobrevivir en condiciones de estrés.

La flor es pentaseccionada, bisexual, generalmente de colores blanca, rosa, azul o violeta, tiene 9 pistilos, el polen es color naranja, en el ovario contiene de 1 a 4 óvulos. El tiempo de floración dura un rango de 24 a 80 días dependiendo del genotipo y el ambiente donde se encuentre la planta, así como del suelo. Generalmente cuando el nivel de humedad baja, las plantas comienzan con la senescencia. La vaina aparece seis días después de la fertilización y toma alrededor de cuatro semanas para el desarrollo completo, el número de vainas por planta depende del genotipo, las condiciones ambientales y la biodisponibilidad de humedad. Generalmente las vainas contienen de 1 a 2 semillas, el desarrollo de las semillas finaliza cuando las hojas comienzan a tornarse amarillas. El nombre “*arietinum*” proviene de la forma de la semilla parecida a un carnero (Aries), la superficie es lisa o tuberculada (Sajja et al., 2017).

Existen dos tipos de garbanzo dependiendo del tamaño y color de la semilla:

- a) Desi: son semillas pequeñas 0.2 g por semilla, tienden a colores crema, amarillo, café, negro y verde. Las flores de este tipo generalmente son violetas por las antocianinas que contiene la flor.
- b) Kabuli: Las semillas son grandes alrededor de 0.3 g por semilla, incluso unas extra grandes pesando arriba de 0.5 g por semilla. Los colores de éstas son crema, beige y blanco. Las flores de este tipo carecen de pigmentación (Sajja et al., 2017).

En cuanto a la germinación, las semillas no necesitan periodo de dormancia, las semillas pueden comenzar a germinar una semana después de sembrarlas, esto a una temperatura de entre 28 y

33 °C con una profundidad de dos pulgadas (Sajja et al., 2017). El cultivo del garbanzo es anual y corto.

A nivel mundial el garbanzo se cultiva en 61 países; entre estos destacan la India, Australia, Estados Unidos, Turquía, Rusia, Etiopía, Myanmar, México, Pakistán, Canadá, entre otros (FAO, 2018). En 2019, México obtuvo una producción de 351,796 toneladas, ocupando el segundo lugar Sonora con una producción de 110,455 toneladas (Atlas agroalimentario, 2019).

Esta leguminosa es una excelente fuente de macro y micro nutrientes, dentro de los macro nutrientes el garbanzo tiene en promedio de 18-28% de proteína no haciendo diferencia entre desi y kalbuli. En cuanto a los carbohidratos tiene oligosacáridos como rafinosa y estaquirosa, entre otros. El contenido de grasa oscila entre 3 y 10%, está compuesto de grasas insaturadas, el 60% del contenido graso es ácido linoleico Omega 6, seguido de ácido oleico omega 9 (Bar-Eldadon et al., 2017).

Con respecto a los micronutrientes como los minerales, se recomienda el consumo de 100 g de garbanzo para obtener 44% de los minerales necesarios diarios. Algunos de los principales minerales son el potasio y el fósforo, que ayudan a mantener el potencial de membrana y en el metabolismo humano. El calcio es otro micronutriente que abarca el 7% del total de micronutrientes, el manganeso, cobre, hierro y zinc son otros micronutrientes presentes en el garbanzo (Bar-Eldadon et al., 2017).

Dentro de las vitaminas el garbanzo tiene vitaminas hidrosolubles como la vitamina B (tiamina, riboflavina, niacina y ácido pantoténico) y C (ácido ascórbico), dentro de las liposolubles se encuentran las vitamina A, E y K (Bar-Eldadon et al., 2017). Sin embargo, existen otros compuestos que se encuentran presentes en el garbanzo que no actúan propiamente como nutrientes, pero ayudan en otras funciones como protectores contra organismos depredadores entre otras funciones. Dentro de este tipo de compuestos se encuentran los compuestos fenólicos.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos naturales son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas principalmente para el crecimiento, reproducción y defensa contra patógenos, predadores o radiación ultravioleta (Xu et al., 2019a). Generalmente se clasifican en flavonoides y no flavonoides (Figura 1).

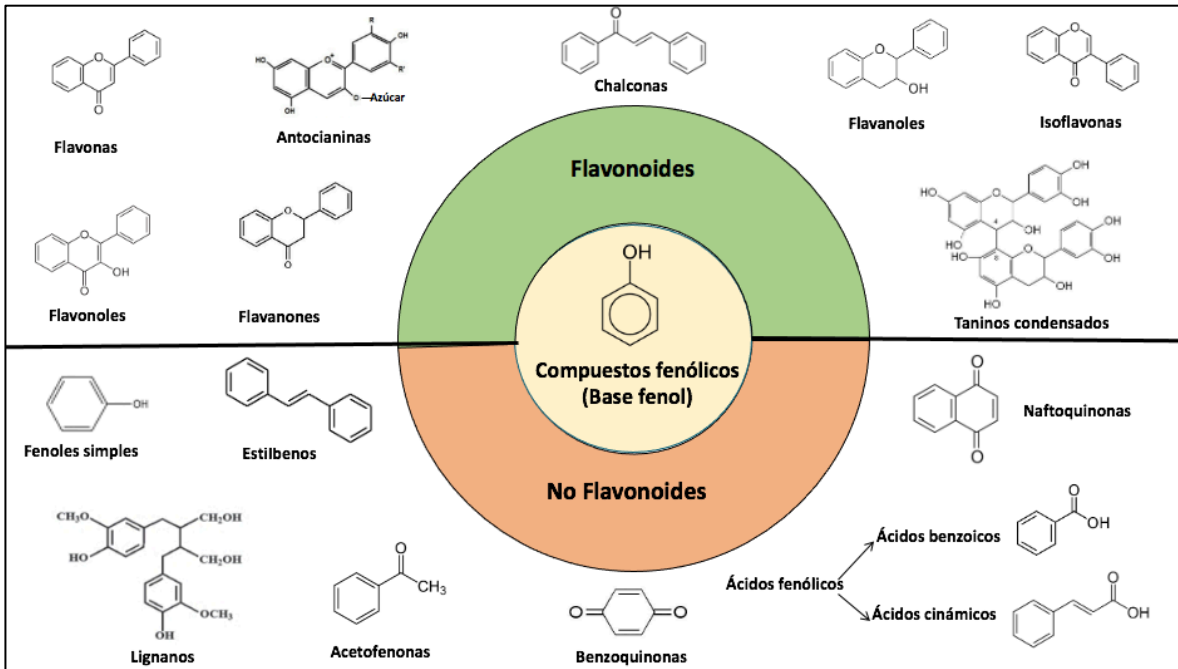


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos. Fuente: Perez-Perez et al. (2018).

Cada grupo tiene características específicas y algunas descripciones de los más abundantes se presentan a continuación:

- **Ácidos fenólicos:** A su vez se pueden clasificar en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, la diferencia entre ellos es la hidroxilación y la metoxilación en sus grupos aromáticos, solo los derivados de los ácidos benzoicos son ácidos fenólicos, y los derivados de ácidos cinámicos son fenilpropanoides. Este tipo de compuestos generalmente se encuentran ligados a la matriz de la planta o alimento, los ejemplos más comunes dentro de los hidrobenczoicos son: gálico, vanílico, siríngico, protocatecuico, elágico que generalmente se encuentran en forma de glucósidos; los hidroxicinámicos:

clorogénico, *p*-cumárico, cefeico, ferúlico, sinápico, generalmente están unidos mediante enlace éster hacia diferentes moléculas (Shahidi et al., 2015).

- Flavonoides: es una de las clasificaciones más grandes, se conocen más de 6000 flavonoides identificados. Estos compuestos tienen como base la estructura C₆-C₃-C₆. Son derivados de 2-fenilcromona, formado por 3 anillos. Se subdividen en: a) Flavonoles: kaempferol, quercetina, rutina, se encuentran en brocoli, cebolla, berries, jitomate; b) Flavononoles: engeletina, astilbina, taxifolina, se encuentran en leguminosas y uvas verdes; c) Flavones: apigenina, crisina, se encuentran en apios; d) Flavanoles: catequina, galatocatequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato, epigalocatequina galato, generalmente encontrados en té; e) Flavonones: narangina, naringenina, taxifolina, eriodictiol, hesperidina, encontradas generalmente en los cítricos. Isoflavonoides: genisteína, daiszeina, encontradas en leguminosas; f) Antocianidinas: epigenidina, cianidina, delphinium, pelargonidina, generalmente encontradas en berries (Shahidi et al., 2015).
- Estilbenos: un claro ejemplo es el *trans*-resveratrol y sus glucósidos, principalmente se ha utilizado como anticarcinogénico y con propiedades antitumorales, generalmente usado como preservador en medicamentos.
- Taninos: se dividen en hidrolizables y condensados, esto por su estructura, se sabe que inhiben la peroxidación lipídica y son buenos atrapadores de radicales como el superóxido y el peróxido (Shahidi et al., 2015).

Los compuestos fenólicos en los alimentos se encuentran conjugados con azúcares como glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácidos glucurónico y galacturónico, o también otro tipo de compuestos como: ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos. Es así como su función biológica depende de los compuestos a los que se encuentran unidos (Duthie et al., 2003).

Generalmente el garbanzo de tipo desi contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos (0.84-6.0 mg/g) que el kabuli (0.022-2.20 mg/g). Dichos compuestos se encuentran de tres diferentes formas:

- a) **Compuestos fenólicos libres:** Compuestos unidos por interacciones hidrofóbicas y se encuentran en las vacuolas de las células vegetales, o enlazados por puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas (Figura 2). En la pared celular se encuentran en una proporción del 20-30% (Quirós, et al., 2012).

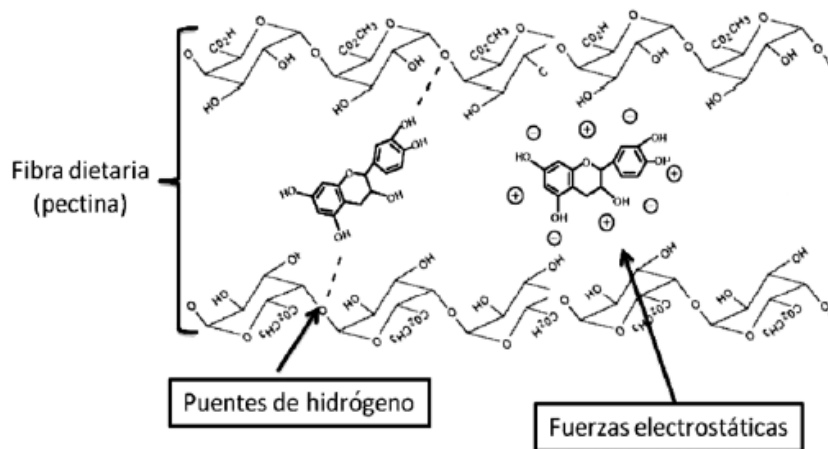


Figura 2. Enlaces de compuestos fenólicos libres en la matriz celular. Fuente Quirós, et al. (2012).

- b) **Compuestos fenólicos conjugados:** Compuestos fenólicos que se encuentran enlazados a proteínas y azúcares por ésteres o éter, se encuentran principalmente en las vacuolas están presentes en una proporción del 1-10% (Acosta-Estrada et al., 2014).
- c) **Compuestos fenólicos ligados:** Compuestos fenólicos enlazados covalentemente (por enlaces éster o éter) a la pared celular con componentes como celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina o proteínas estructurales (Figura 3). Éstos representan alrededor del 79 al 90% del total de los compuestos fenólicos (Acosta-Estrada et al., 2014).

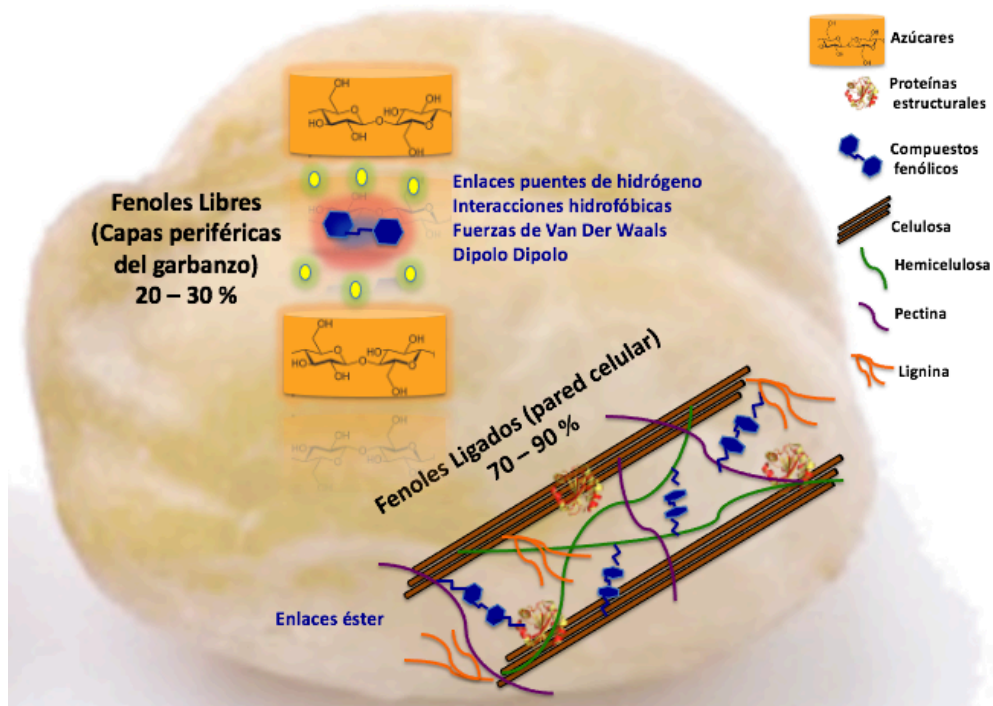


Figura 3. Compuestos fenólicos libres y ligados a la matriz celular del garbanzo. Fuente: Perez-Perez et al. (2018).

Algunos estudios han cuantificado la cantidad de fenoles totales, libres y ligados de diferentes muestras de garbanzo (Tabla 1). En estos estudios se comprueba que la mayor cantidad de los compuestos fenólicos del garbanzo son los ligados.

Los compuestos fenólicos encontrados en el garbanzo principalmente son los ácidos hidroxibenzoicos, flavonoides, aldehídos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianinas y glucósidos de flavonoles e isoflavinas. Sin embargo, su contenido puede variar de garbanzo crudo a cocido y también dependiendo del tipo de cocimiento, e inclusive si es un garbanzo germinado o no (Tabla 2).

Tabla 1. Contenido de compuestos fenólicos totales, libres y ligados en garbanzo

Fenoles totales (mg EAG*/g)	Fenoles libres (mg EAG*/g)	Fenoles ligados (mg EAG*/g)	Tipo muestra de garbanzo	Referencia
0.34	0.21	0.15	Crudo	Wang <i>et al.</i> , 2016
1.31	0.29	1.08	Crudo Café -ICC3512	
1.33	0.31	1.02	Crudo Rojo- ICC13124	
1.35	0.34	1.07	Crudo Negro ICC3761	
1.43	0.48	0.95	Extrudido Café -ICC3512	Heiras-Palazuelo <i>et al.</i> , 2013
1.40	0.51	0.89	Extrudido Rojo- ICC13124	
1.44	0.54	0.98	Extrudido Negro ICC3761	

* mg EAG: miligramos de Equivalentes de Ácido Gálico

Tabla 2. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en garbanzo

Referencia	Compuesto fenólico	Compuestos fenólicos totales (µg/g)					
		Fenoles Libres (µg/g)	Fenoles Ligados (µg/g)	Garbanzo Crudo	Garbanzo Germinado	Garbanzo Cocido tradicional	Garbanzo Cocido por microondas
Wang <i>et al.</i> , 2016	Isoquercitrina	95.01	-	-	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Quercitrina	99.02	-	-	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Quercetina	90.80	-	-	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido gálico	70.79	82.85	40.2	-	12.6	20.8
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*		-	-	194.9	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido	95.34	110.98	358.9	514.2	466.8	312.1
Xu <i>et al.</i> , 2019b	protocatecuico	35.0	2.8	-	37.8	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Acido p-hidroxi	-	-	10.5	14.9	-	53.3
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	benzoico	-	-	49.1	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido gentísico	-	-	26.0	34.4	13.6	18.5
Xu <i>et al.</i> , 2019b		-	21.4	-	21.4	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*		-	-	0.4	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido vanílico	-	-	80.8	70.2	7.54	45.1
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*		-	-	0.78	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido siríngico	-	-	222.1	186.9	222.1	354.9
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido p-cumárico	-	-	-	-	0.33	0.46
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido ferúlico	-	-	0.90	-	0.97	0.84
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*		-	-	4.1	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido sinápico	-	-	7.81	-	0.47	0.49
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	hexósido	-	-	235.6	-	-	-
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido salicílico	-	-	-	-	76.6	6.57
Gavirangappa <i>et al.</i> , 2014	Ácido cinámico	-	-	-	-	-	2.93
Xu <i>et al.</i> , 2019 ^a	Hesperetina	2.9	0.8	-	3.7	-	-
Xu <i>et al.</i> , 2019a	Kaempferol	-	21.2	-	21.2	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*		-	-	0.38	-	-	-
Xu <i>et al.</i> , 2019 ^a	Prunetina	11.2	17.8	-	39.0	-	-
Xu <i>et al.</i> , 2019 ^a	Gliciteína	31.2	26.2	-	74.5	-	-
Xu <i>et al.</i> , 2019 ^a	Formononetina	17.6	26.6	-	44.2	-	-
Xu <i>et al.</i> , 2019 ^a	Pseudobaptigenina	14.1	7.5	-	21.6	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	Ácido dihidroxibenzoico	-	-	2.4	-	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	Ácido benzoico	-	-	3.7	-	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	Catequina	-	-	48.5	-	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	Catequina pentósido	-	-	71.2	-	-	-
Quintero-Soto <i>et al.</i> , 2018*	Rutina	-	-	0.26	-	-	-

*Los datos fueron del garbanzo kabuli blanco. [†]Los datos fueron del cuarto día de germinación.

Compuestos fenólicos en atmósferas modificadas

La preservación de los compuestos fenólicos en los alimentos es de vital importancia es por eso que existen diversas técnicas para alargar la vida de anaquel de estos componentes, una de ellas es el uso de atmósferas modificadas. El utilizar atmósferas modificadas permite cambiar o mantener el ambiente donde se encuentra, en este caso el alimento, al cual se aplica vacío para después envasar con una concentración de gases conocida (Gómez-Sánchez et al., 2007; Ospina-Meneses et al., 2008; Andrade et al., 2012).

Generalmente los gases más utilizados son: oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono, los cuales de manera individual o combinada producen un efecto para mantener la calidad de los alimentos ya sea crudos o cocinados. Generalmente en los alimentos listos para consumir se utilizan atmósferas con concentraciones disminuidas de oxígeno y aumentadas en nitrógeno y dióxido de carbono.

Oxígeno. Favorece el crecimiento de organismos aerobios y enrarecimiento de diversos productos, pero a pesar de esto es utilizado para la carne fresca (60-80% de oxígeno en la atmósfera) mientras que para frutas o verduras se recomienda un valor menor de 20% en la atmósfera (García de Fernando et al., 2011).

Nitrógeno. Se considera un gas inerte idóneo para la conservación de alimentos y bebidas, generalmente este gas sustituye al oxígeno, sobre todo en alimentos ricos en lípidos. Puede utilizarse como gas de relleno cuando se utilizan grandes cantidades de CO₂ y así evitar el colapso del envase.

Dióxido de carbono. Se considera un gas bacteriostático en las bacterias Gram negativas, favorece el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, debido que el gas al disolverse provoca una acidificación que disminuye la capacidad de retención de agua de las proteínas y una excesiva exudación. Se debe tomar en cuenta que existen microorganismos capaces de crecer en atmósferas saturadas de CO₂ (García de Fernando et al., 2011).

Es así como técnicas como las atmósferas modificadas pueden ayudar a conservar los compuestos fenólicos por más tiempo, debido que las reacciones bioquímicas se vuelven más lentas, y sin renunciar a las características iniciales del producto, garantizando la preservación de los diferentes metabolitos en el alimento, aprovechando, en este caso las actividades biológicas del garbanzo, como la capacidad antioxidante.

Capacidad antioxidante

Una de las propiedades más importantes de los compuestos fenólicos es la capacidad antioxidante, es decir estos compuestos capturan y tienen una capacidad quelante sobre los radicales libres y esto se debe a que los compuestos fenólicos contienen grupos hidroxilos unidos a los bencenos, por lo tanto, los radicales libres pueden interaccionar con los electrones del anillo o bien formar complejos con metales divalentes o trivalentes como el hierro y el aluminio. Se sabe que, compuestos como el ácido gálico, miricetina, quercetina, catequina, ácido sináptico y sus derivados son los principales causantes de la actividad antioxidante del garbanzo (Perez-Perez et al.,2018; Soobrattee et al., 2005).

Así pues este tipo de compuestos pueden prevenir o tener un efecto positivo en enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cánceres, así como enfermedades tan importantes como la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico. El consumo de garbanzo se ha asociado a disminuir el riesgo de diversos cánceres como el colorrectal, el de próstata, el de pulmón y se ha demostrado que contribuye en la disminución del colesterol (Jukanti, 2012; Pittaway, et al., 2008). Algunos métodos para evaluar la capacidad antioxidante, se basan en la captación de radicales como el 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH) y el 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS). La molécula de DPPH y la de ABTS son radicales libres sintéticos estables, que al momento de estar en contacto con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno (antioxidante), reduce a los radicales con la pérdida del color violeta intenso a una absorbancia de 517 nm en el caso del radical DPPH (Molyneux, 2004;Castañeda 2008), y en cuanto al método ABTS consiste en la generación del radical ABTS^{•+}, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un color azul verdoso con absorbancias

máximas a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. En presencia de compuestos antioxidantes se produce una disminución de la absorbancia del radical catiónico ABTS•+, ya que le es transferido un electrón por parte del antioxidante, por lo tanto de radical ABTS•+ (forma oxidada) pasa a su forma reducida ABTS (Gutiérrez et al., 2008).

Otros métodos, por ejemplo el poder antioxidante de reductor férrico (FRAP), se basan en la transferencia de electrones en ambiente ácido y presencia de antioxidantes reductores, donde la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina (Fe^{+3} -TPTZ) se reduce hasta su forma ferrosa (Fe^{+2} -TPTZ) produciendo una coloración intensa que a 593 nm presenta su máxima absorción (Rodríguez-Roque et al., 2012; Benzie, 1996). Otra técnica más es el ensayo 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH), donde éste se descompone por factores como el calor lo que produce radicales libres que pueden ser directamente citotóxicos o bien reaccionar con el oxígeno para producir radicales alcoxilo y peroxilo mediante mecanismos nucleofílicos. Esta técnica se basa en la hemólisis oxidativa, donde se estimula al eritrocito a incrementar la producción de NADPH necesario para la eliminación del peróxido de hidrógeno y los radicales libres del oxígeno. Existe proteólisis y peroxidación lipídica en la membrana del eritrocito por parte de los radicales libres generados por el AAPH, esto provoca la creación de vacuolas desde el interior del eritrocito lo que provoca la extracción de hemoglobina entre otros compuestos. La absorbancia de la hemoglobina expuesta es medida a 540 nm. En esta técnica los antioxidantes ayudan transfiriendo protones para estabilizar el radical e impedir el contacto con la membrana del eritrocito (Lu et al., 2010).

La cuantificación de compuestos fenólicos es una técnica que aunque no evalúa la capacidad antioxidante, va de la mano junto con las técnicas antioxidantes para relacionarlas probablemente con los compuestos fenólicos. El fundamento de la técnica se basa en que los compuestos fenólicos presentes se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual se encuentra formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno en un medio básico de Na_2CO_3 . La coloración azul produce una absorbancia máxima de 750 nm. La reacción es de óxido-reducción, en la cual el ión fenolato es oxidado bajo condiciones alcalinas, mientras que

el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico se reduce y produce una solución coloreada de azul (Gutiérrez et al., 2008).

Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos

El aprovechamiento de los efectos benéficos de los compuestos fenólicos depende de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. En cuanto a la ingesta, se estima que las personas consumen de 100-150 mg/día de flavonoides en los alimentos, también se consume una cantidad considerable de ácidos hidroxicinámicos, antocianos, y proatocianinas que son compuestos que se encuentran en el vino, café y té (Manach et al., 2004). Para que estos compuestos sean aprovechados al máximo es necesario una correcta bioaccesibilidad (Figura 4), es decir la liberación de los compuestos fenólicos de la matriz del alimento en el organismo, y que además estos compuestos se encuentren biodisponibles, que quiere decir que estos compuestos se absorban y ejerzan su acción (Balde, 2014).

En los alimentos los compuestos fenólicos pueden estar enlazados con ésteres, glicósidos o diferentes polímeros y por lo tanto no es fácil la absorción directa en el intestino delgado, que es donde se lleva a cabo la mayor parte de la absorción de los alimentos, solo una parte de estos compuestos fenólicos (libres y conjugados) pueden ser hidrolizados en el intestino. Uno de los mecanismos para la absorción de estos compuestos es por parte de enzimas como la lactasa-floricina-hidrolasa (LPH) que se encuentra en los enterocitos, que actúa en la liberación de las agliconas en los enlaces O- β -D-glucosídicos, las cuales ingresan por difusión pasiva en el enterocito ya que en ese momento son más liposolubles que unidas al azúcar. Otro de los mecanismos para ingresar los compuestos fenólicos al enterocito, implica proteínas de transporte y la hidrólisis intracelular de la enzima β -glicosidasa citosólica (CBG) (Marín et al., 2015). Sin embargo, en los compuestos fenólicos ligados, al estar unidos a matrices poliméricas del alimento, se requieren enzimas específicas para lograrlo, las cuales generalmente las contiene la microbiota intestinal humana.

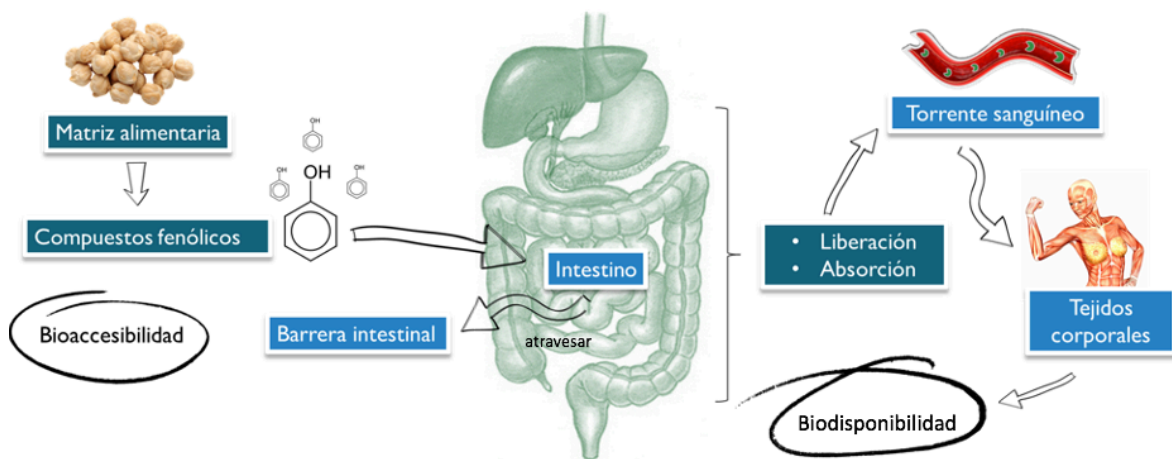


Figura 4. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Fuente: Perez-Perez et al. (2018).

Interacción de la microbiota intestinal humana con los compuestos fenólicos

El término “microflora” o “microbiota” intestinal hace referencia al ecosistema microbiano que coloniza el tracto gastrointestinal, el cual incluye especies nativas (adquiridas al nacer y durante el primer año de vida) que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal (Perez-Perez et al., 2018). La fracción de los compuestos fenólicos no absorbidos en el intestino delgado va directo al intestino grueso y comienza a metabolizarse por las bacterias presentes. Algunas enzimas bacterianas como la β -glucuronidasa pueden liberar la agliconas y romper los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos, que trae como consecuencia la producción de ácidos aromáticos simples que pueden absorberse junto con el agua, después de su transformación en derivados del ácido benzoico (Crozier et al., 2010).

En cuanto a las transformaciones de los compuestos fenólicos por parte de la microbiota intestinal intervienen dos factores, el primero es la carga microbiana de cada individuo ya que existen biotransformaciones específicas en donde la presencia de polifenoles específicos requieren la participación de especies o cepas particulares dotados de genes especiales que codifican para enzimas precisas, como las responsables de generar urolitinas que son metabolitos secundarios derivados de ácido elálgico. El segundo factor es la subfamilia de los

compuestos fenólicos por ejemplo los flavonoides como el kaempferol, quercetina y miricetina que generalmente se encuentran glicosilados, y son degradados más lentamente. Estos compuestos suelen ser hidrólizados por *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Enterococcus casseliflavus*, y *Eubacterium ramulus* y debido a su lenta transformación, son más biodisponibles porque suelen ser absorbidos y metabolizados en el hígado (Rechner et al., 2004).

Las flavanonas como hesperetina y naringenina son abundantes en cítricos y más biodisponibles, debido a que son degradadas fácilmente por la microbiota y por lo tanto la absorción es más rápida. Los flavanoles como catequinas, epicatequinas y galocatequinas, son oligómeros grandes que pasan directamente al intestino grueso donde regularmente se transforman a pyrogallol. Los géneros de bacterias que transforman a estos compuestos son *Bifidobacterium* y *Clostridium* (Crozier et al., 2010).

Las antocianidinas como cianidina, pelargonidina y malvidina, son biotransformados en ácidos como el vanílico, ploroglucinol, protocatecuico, gálico, siríngico y *p*-cumárico. Algunas bacterias responsables de esta biotransformación son *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., y *Enterococcus* (Rechner et al., 2004).

Las isoflavonas como daidzeína y genisteína, se encuentran generalmente como glucósidos, y se encuentran presentes en la familia *Fabaceae*. Para la biodisponibilidad de estos compuestos es necesario convertirlos en agliconas a través de enzimas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Veionella*, *Escherichia*, entre otros (Crozier et al., 2010).

Los flavones como luteolina y apigenina, se encuentran presentes en cereales, leguminosas y diversas frutas. Estos compuestos se hidrolizan en el intestino delgado pero las agliconas resultantes se deben transformar en el intestino grueso por las bacterias, generalmente por los géneros *Clostridium* y *Enterococcus* (Rechner et al., 2004).

Los taninos hidrolizables como los galotaninos y elagitaninos, se transforman dependiendo el tipo de tanino. Los primeros pueden transformarse en ácido gálico, mientras que los segundos sufren lactonización produciendo ácido elágico (Crozier et al., 2010).

Los lignanos incluyen compuestos fenólicos juntos como el secoisolariciresinol, matairesinol y pinoresinol. Éstos se encuentran en semillas y cereales. Para la biotransformación de estos compuestos es necesario la presencia de bacterias como *Bacteroides* y *Clostridium* (Crozier et al., 2010).

Los ácidos clorogénicos como ácido cafeico, ferúlico y *p*-cumárico unidos a ácido quínico forman estructuras conjugadas. Son biotransformados por bacterias de los géneros *Escherichia*, *Bacteroides* y *Lactobacillus*, esto gracias a las desesterificaciones, reducción de dobles enlaces, y deshidroxilación, que pueden producir ácido clorogénico, vainillina o ácido propiónico (Rechner et al., 2004).

Liberación de compuestos fenólicos por enzimas

La liberación o transformación de los compuestos fenólicos a nivel del intestino grueso, ocurre gracias a la acción de enzimas producidas por bacterias de los mismos intestinos. Las enzimas son una herramienta que facilita la liberación de compuestos fenólicos hidrolizando la pared celular, y también despolimerizando los polisacáridos. Se sabe que algunas de estas enzimas pueden ser esterasas, glucosidasas, xilanasas entre otras (Bernal-Jasso, 2020).

Las esterasas son enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces formados por los ácidos carboxílicos y alcoholes. La síntesis de este tipo de enzimas en algunos microorganismos puede ser constitutiva, pero en otros depende de sustancias inductoras presentes en el medio (Lozano et al., 2001). La esterasa de ácido ferúlico y esterasa de ácido *p*-cumárico son enzimas que se ha demostrado que ayudan a la bioaccesibilidad de los fenoles (Cooper-Bribiesca, 2013).

Algunos géneros reportados que sintetizan enzimas para la degradación de paredes celulares son *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, entre otros. Estos géneros de

bacterias degradan diversos compuestos de la pared celular como fuente de carbono, tal es el caso de la pectina, que se encuentra en la pared celular de las plantas. La bacteria despolimeriza y desesterifica estos compuestos por medio de enzimas extracelulares como las esterases, liberando así los compuestos fenólicos (Cubero-Agüero, 2019).

Pocos son los estudios realizados en leguminosas sobre la liberación por la microbiota intestinal humana, de los compuestos fenólicos ligados. La mayoría de los estudios se han enfocado en el frijol, donde las esterases de la microbiota pueden liberar ácido diferúlico de los polisacáridos (Andreasen et al., 2001). Chen et al. (2015) demostraron que las enzimas pectinasas, arabanasa, celulasas y B-glucanasas podían liberar ácido ferúlico, ácido sinápico, flavanoles, ácido *p*-cumarico, ácido *p*-hidroxibenzoico, epicatequina y catequina en frijol cargamanto. Sin embargo, en garbanzo no se ha realizado este tipo de estudios, sobre todo enfocando directamente al perfil enzimático de la microbiota en conjunto que pudiese liberar a los compuestos fenólicos ligados. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar el perfil enzimático utilizado por la microbiota intestinal humana para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas.

JUSTIFICACIÓN

El contenido fenólico en granos ha sido comúnmente subestimado en la literatura, porque los fenoles ligados (aproximadamente 80% de los fenoles totales) a la matriz del alimento generalmente no se estiman en los estudios. Existe evidencia de que los fenoles ligados al llegar al intestino se pueden liberar por medio de la fermentación de los alimentos producidos por la microbiota presente en el intestino grueso. De esta forma, estos fenoles se vuelven bioaccesibles y pueden entonces absorberse e incrementar el beneficio de estos compuestos en el organismo (biodisponible). Sin embargo, los estudios se han enfocado en su mayoría a la liberación y transformación de estos compuestos fenólicos sobre todo en cereales, en menor medida en legumbres, pero no se han podido explicar los mecanismos precisos ni el perfil enzimático del que la microbiota hace uso para lograr esta acción. La obtención del perfil enzimático permitirá identificar enzimas específicas que podrían ser utilizadas para liberación y transformación selectiva de fenoles de otras matrices de alimentos que pudieran incluir a los desechos agroindustriales por lo tanto se podría implementar un proceso amigablemente ecológico para la obtención de estos compuestos bioactivos. Los compuestos fenólicos liberados por estas enzimas se pueden considerar como naturales por las autoridades regulatorias.

Por otra parte, una desventaja de los compuestos fenólicos es que pueden ser susceptibles a la degradación durante el almacenamiento disminuyendo paulatinamente su capacidad antioxidante. Es por eso que se recomienda analizar métodos de conservación, como atmósferas modificadas, ya que pueden disminuir el grado de respiración del alimento, reducir el crecimiento microbiano y retrasar el deterioro enzimático.

HIPÓTESIS

Las atmósferas modificadas pueden preservar los compuestos fenólicos del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido. Adicionalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ligados puede incrementar al liberarlos de la matriz del alimento. Finalmente, el perfil enzimático utilizado por la microbiota intestinal humana para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) son en su mayoría del tipo esterases.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar el perfil enzimático utilizado por la microbiota intestinal humana para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas.

Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del garbanzo crudo y cocido
- Cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del garbanzo cocido almacenado bajo atmósferas modificadas.
- Determinar la bioaccesibilidad y digestibilidad de los compuestos fenólicos del garbanzo en un modelo gastrointestinal *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la microbiota intestinal humana sobre la liberación y transformación de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo.
- Identificar el perfil enzimático relacionado con la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el garbanzo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta la metodología en general (Figura 5) y los esquemas generales de las metodologías realizadas de cada uno de los objetivos. Posteriormente se describen más a detalle los procedimientos. El trabajo se dividió en 3 fases:

FASE 1 (Figura 6 y 7):

- Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del grano de garbanzo.
- Cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del garbanzo cocido bajo atmósferas modificadas.

FASE 2 (Figura 8):

- Determinación de la bioaccesibilidad y digestibilidad de los compuestos fenólicos del garbanzo en un modelo gastrointestinal *in vitro*.

FASE 3 (Figura 9 y 10):

- Evaluación del efecto de la microbiota intestinal humana sobre la liberación y transformación de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo.
- Identificación del perfil enzimático relacionado con la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el garbanzo.

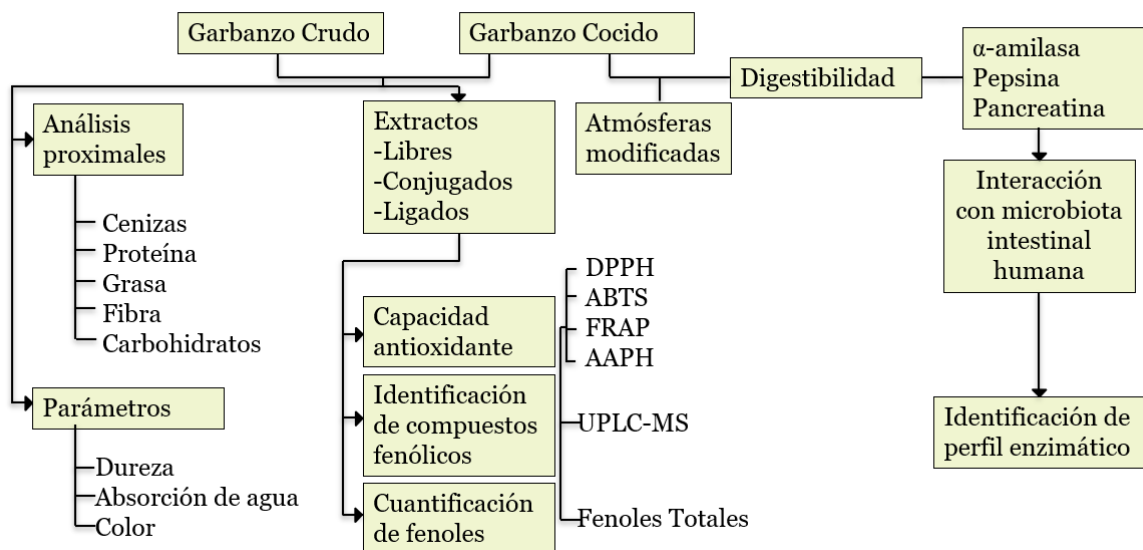


Figura 5. Esquema general de la metodología

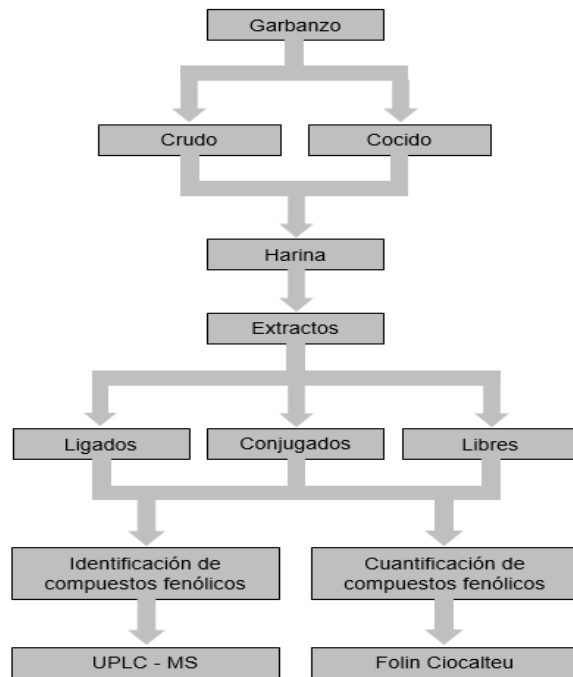


Figura 6. Esquema objetivo particular 1

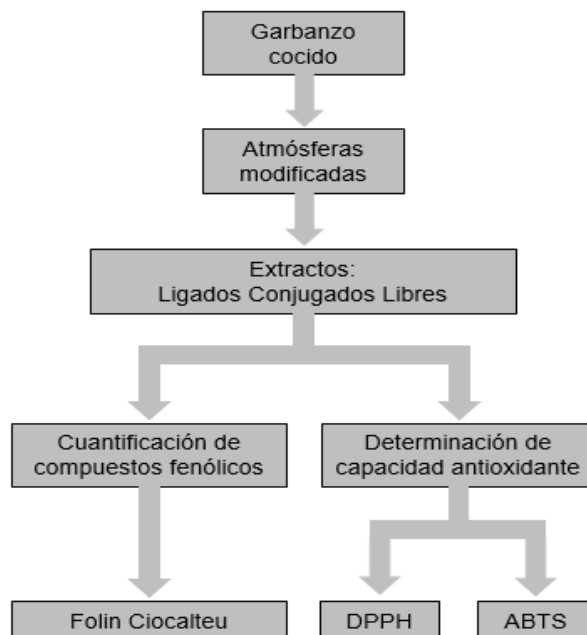


Figura 7. Esquema objetivo particular 2

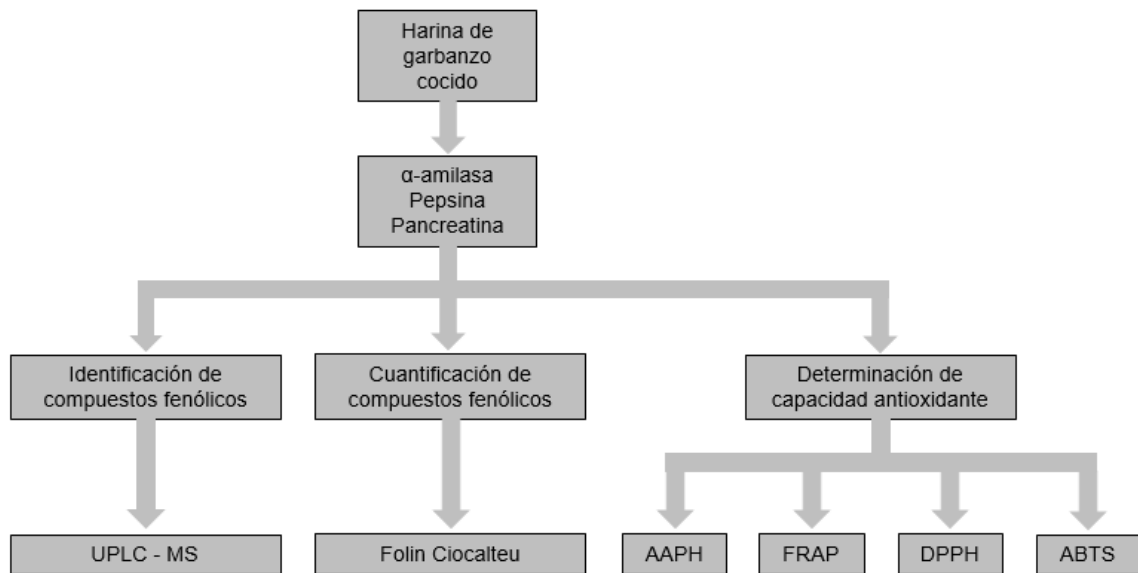


Figura 8. Esquema objetivo particular 3

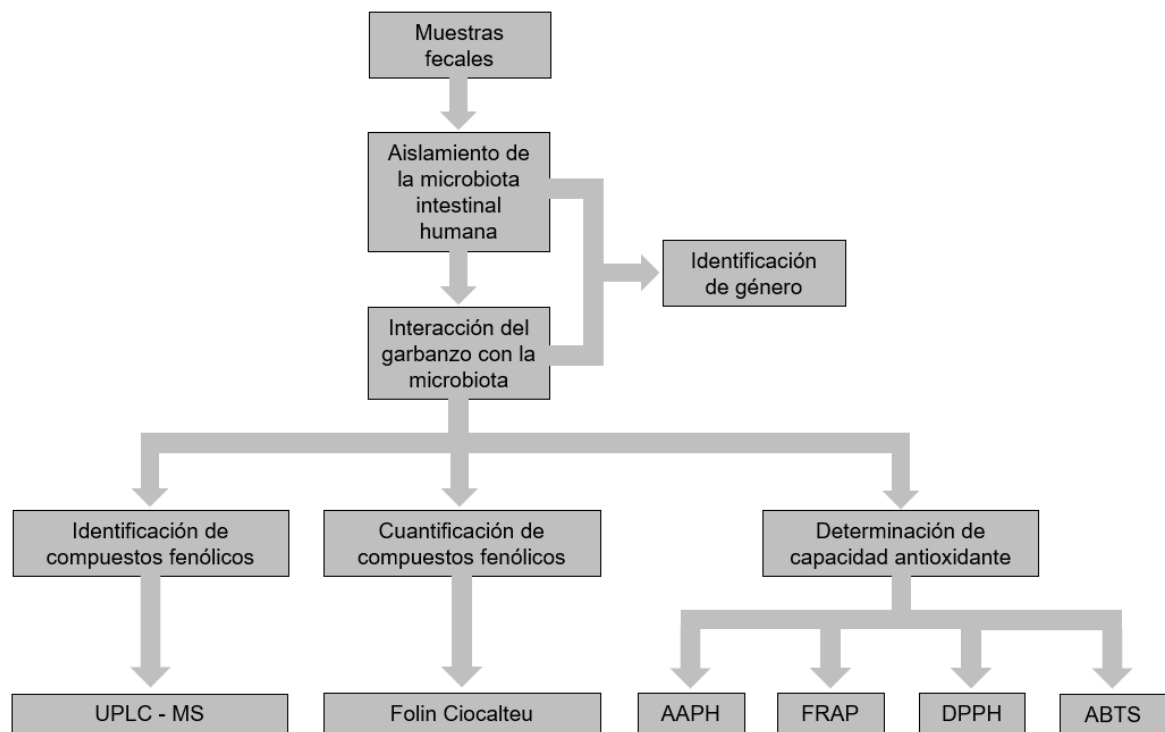


Figura 9. Esquema objetivo particular 4

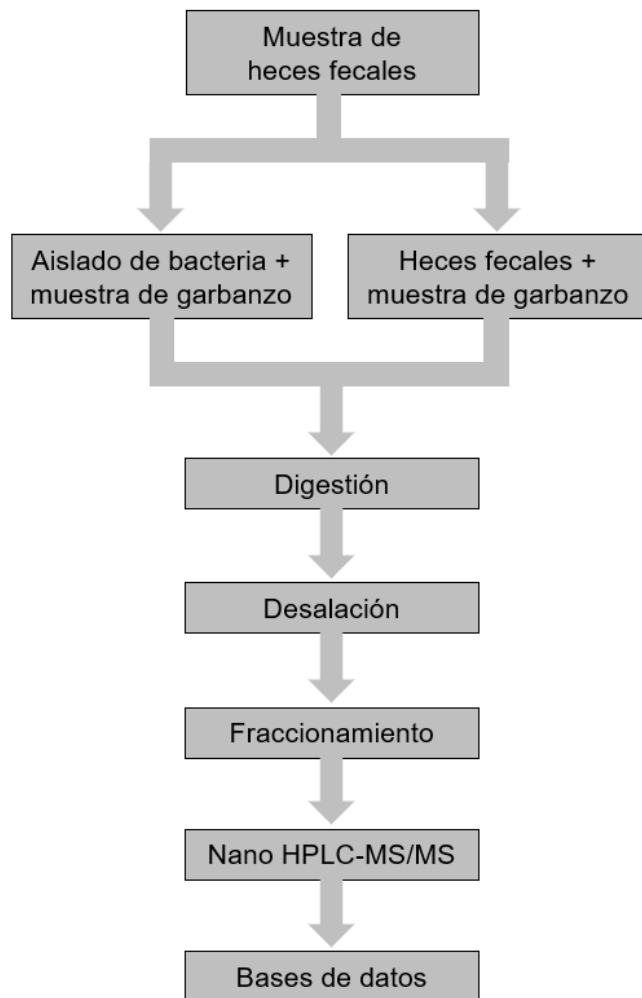


Figura 10. Esquema objetivo particular 5

FASE 1

Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del grano de garbanzo y determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del garbanzo cocido bajo atmósferas modificadas.

Obtención de la muestra

Los garbanzos (*C. arietinum* var. Blanoro), tipo Kabuli fueron proporcionados en 2019 desde Campo Covadonga en Hermosillo, Sonora, México. Las coordenadas fueron longitud: - 111.483056 W y latitud: 28.880556 N a 70 metros sobre el nivel del mar.

Preparación de la muestra

Los granos de garbanzo se cocinaron según el método de Segev et al. (2012), con algunas modificaciones. Los granos (500 g) se pusieron en remojo en 2.5 L de agua durante 22 h y, después, los granos se cocinaron al vapor durante 60 min. Durante el remojo, se determinó la absorción de agua y la textura como se describe más adelante. A los granos crudos y cocidos se les realizó un análisis proximal y se determinó el color. El estudio de atmósferas controladas y la digestibilidad se determinaron sólo en las muestras cocidas. Para las extracciones fenólicas (libres, conjugadas y ligadas) y el análisis de la capacidad antioxidante, las muestras crudas y cocidas se liofilizaron (Freeze Zone 4.5, Labconco) y se molieron en un molino de laboratorio Perten modelo LM3100 (PerkinElmer, EE.UU.) hasta un tamaño final de partícula de 0.5 mm de malla.

Almacenamiento en atmósferas modificadas

Los granos de garbanzo cocidos (50 g) se colocaron en bolsas de propileno GrainPro (11 x 15 cm) y se expusieron a CO₂ (100 %), N₂ (100 %) y aire (CO₂: 0.0 %, O₂: 10.5 %, N₂: 89.5 %)

como control mediante un mezclador de gases (Thermco, www.thermco.com). El aire de las bolsas se desplazó con los gases; las bolsas se cerraron hasta alcanzar la concentración de gases deseada. Los gases se controlaron con un analizador de gases (Viasensor, www.viasensor.com). Las temperaturas de los tratamientos fueron -20 °C, 4 °C, 25 °C y 50 °C. La capacidad antioxidante por DDPH, ABTS y los fenoles totales (libres, conjugados y ligados) se monitorizaron a los 0, 25 y 50 días.

Caracterización fisicoquímica del garbanzo (análisis proximal)

Se analizó el garbanzo crudo y cocido para determinar la proteína (método 955.04) y las cenizas (método 920.153) utilizando los métodos de la AOAC (AOAC 2000). La fibra total (método 985.29), la grasa (método 920.85) y la humedad (método 952.08) se determinaron según la AOAC (AOAC 1997). Los hidratos de carbono se determinaron por diferencia.

Determinación de parámetros de calidad tecnológica: absorción del agua textura (dureza) y color

Absorción de agua

La absorción de agua se evaluó antes de la cocción, midiendo el peso de los granos durante el proceso de remojo. La curva de absorción aumentó con el peso de los granos en función del tiempo. Se tomaron 15 granos por triplicado con 65 mL de agua, y las mediciones se realizaron a intervalos de 2 h hasta las 22 h. El porcentaje de absorción se midió según la siguiente ecuación:

$$Eq. (1) \% \text{ absorción de agua} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100$$

Donde, M_0 y M_t es la masa de los granos antes del remojo y a diferentes intervalos de remojo, respectivamente.

Determinación de textura (dureza)

La textura se midió basándose en la metodología de Ponce-García et al. (2013) mediante un texturómetro Instron 4465 (Instron Corporation, Canto, MA, USA). El área de contacto de una semilla individual se midió semilla por semilla. La deformación del grano fue del 50% con una velocidad de 0.2 mm/s. Los resultados se expresaron en Newtons.

Determinación de color

El color se determinó con un colorímetro HunterLab Miniscan XE Model (Hunter Association Laboratories, Reston, VA, USA). Las semillas se homogeneizaron mediante 17 lecturas. El resultado se realizó mediante la luminosidad (L^*) evaluada en una escala de 100 (blanco) a 0 (negro), a^* donde $+a^*$ es rojo y $-a^*$ es verde, y b^* indica los tonos amarillos ($+b^*$) y azules ($-b^*$) (Escalante-Aburto et al., 2014). Se calculó ΔE para las diferencias entre dos muestras (Reyes-Moreno et al., 2002). Se determino de acuerdo con la ecuación 2:

$$Eq. 2 \Delta E = [(L_s - L)^2 + (a_s - a_m)^2 + (b_s - b_m)^2]^{1/2}$$

Extracción de compuestos fenólicos en el garbanzo

Extracción de compuestos fenólicos libres

Los compuestos fenólicos fueron extraídos de harinas de garbanzo crudo y cocido de acuerdo con el método descrito por Cabrera-Soto et al. (2009), con modificaciones. Las muestras crudas y cocidas (15 g) se homogeneizaron en una placa de agitación con 30 mL de agua:metanol (20:80, v/v) durante 1 h a 100 rpm. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y el residuo se utilizó para una segunda extracción empleando el mismo procedimiento. Los sobrenadantes se combinaron y se evaporaron en un evaporador rotatorio (RE301, Yamato, Santa Clara, CA, EE.UU.) a 45-50 °C hasta 15 mL. A continuación se añadieron 5 mL de agua destilada y se lavaron dos veces con acetato de etilo en

proporción 1:1 v/v con la muestra. La fase de acetato de etilo se evaporó y se reconstituyó hasta un volumen final de 2 mL con metanol (extracto fenólico libre). La fase acuosa se guardó para los fenoles conjugados y el sedimento para la extracción de los fenoles ligados.

Extracción de compuestos fenólicos conjugados

Para los fenoles conjugados solubles, la fase acuosa se aforó hasta 20 mL con agua destilada. La aplicación de ultrasonido de alta energía (Digital Sonifier 250; Branson, México) se utilizó como alternativa para mejorar la extracción fenólica. A la muestra se le aplicó ultrasonido al 40% de amplitud durante 59 s con un tiempo libre de 30 s hasta completar 1 h a 20 kHz. Durante la sonicación, las muestras se mantuvieron en un baño de hielo. Tras dos extracciones con acetato de etilo (1:1 v/v disolvente/muestra), la muestra se evaporó y se reconstituyó hasta un volumen final de 2 mL con metanol (extracto fenólico conjugado).

Extracción de compuestos fenólicos ligados

El sedimento obtenido en el procedimiento fenólico libre se ajustó a 30 mL de agua:metanol (20:80, v/v) para obtener el extracto fenólico ligado. La muestra se ultrasonificó en las mismas condiciones que los fenoles conjugados. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y el residuo se utilizó para una segunda extracción empleando el mismo procedimiento. Los sobrenadantes se combinaron y, tras dos extracciones con acetato de etilo (1:1 v/v disolvente/muestra), se evaporaron y se resuspendieron hasta un volumen final de 2 mL con metanol (extracto fenólico ligado).

Cuantificación de Fenoles Totales

Este método espectrofotométrico se ensayó utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu en un formato de microplaca de 96 pocillos. Brevemente, se mezclaron 10 µL de la muestra con 25 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 25 µL de Na₂CO₃ (20%) y 140 µL de agua desionizada, y se registró la absorbancia a 760 nm. Se preparó una curva de calibración estándar de ácido gálico (0-100

mg/L). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra. (Eldeen et al., 2011).

Medición de la capacidad antioxidante

Método del 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH)

Se basó en la metodología de Molyneux (2004). Se mezclaron 200 μL de la solución metanólica del radical DPPH (6×10^{-5} mol/L) con 20 μL de la muestra. Esta preparación se midió a 515 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, NY, USA) después de un tiempo de incubación de 120 min en la oscuridad. El blanco fue el disolvente. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados se expresaron como nanomoles de equivalente de Trolox por g de muestra (nmol TE/ g de muestra) para el análisis de digestión *in vitro* y como porcentaje de inhibición de radicales para el estudio en atmósfera controlada se utilizó la siguiente ecuación 3:

$$\text{Eq. (3) \% of inhibición} = \frac{\text{absorbancia inicial} - \text{absorbancia final}}{\text{absorbancia inicial}} \times 100$$

Método del 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)

El método ABTS se basó en la metodología de Re et al. (1999). El radical (ABTS^{•+}) se formó disolviendo 19.3 mg de ABTS en agua (5 mL). Se añadió una alícuota de 88 μL de una solución de persulfato de potasio (0.0378 g/mL) a la solución de ABTS. La mezcla se dejó durante 12 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.700 ± 0.050 a 734 nm. La muestra (20 μL) se mezcló con 270 μL de solución de radicales y se incubó en la oscuridad durante 120 min. El blanco y las determinaciones a 734 nm fueron los mismos que en el ensayo de DPPH.

Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para el ensayo de FRAP se siguió el método de Benzie et al. (1996). El ensayo de poder antioxidante férrico reductor (FRAP) sigue la reacción de Fe^{3+} -TPTZ a 638 nm. Primero se prepararon las soluciones madre: tampón de acetato de sodio (300 mmol/L, pH 3,6), FeCl_3 (20 mmol) y solución de TPTZ (10 mM) en HCl (40 mM). La solución de trabajo FRAP se preparó 10:1:1 (tampón: FeCl_3 : TPTZ). A continuación, se combinó un volumen de 20 μL de la muestra con 280 μL de solución FRAP y se colocó en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, NY, USA). Después de 30 minutos, se leyó la absorbancia a 638 nm. Los resultados se expresaron como nanomoles de Trolox equivalente por g de muestra.

Evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos

Se utilizó AAPH (2,2'-azobis-[2-metilpropionamidina]) para la evaluación del efecto protector sobre los eritrocitos humanos, de acuerdo con el método descrito por Lu et al. (2010) con algunas modificaciones. En este ensayo, se utilizó el AAPH para inducir la formación de radicales libres de la membrana eritrocitaria que provocan la hemólisis para evaluar la capacidad antioxidante de la muestra mediante la inhibición de los radicales formados por el AAPH, evitando así la hemólisis. En primer lugar, se recolectaron eritrocitos de un voluntario adulto sano del tipo A+ de 30 años de edad, siguiendo la normativa mexicana (NOM-253-SSA1-2012) e internacional (FDA: CFR - Code of Federal Regulations Title 21, part 640). El Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora, acreditó el proyecto relacionado a este estudio (Anexo 2).

El paquete globular se separó del plasma por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. Los eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con buffer de fosfato (PBS) de pH 7.4. Después, se preparó una suspensión de eritrocitos en PBS con una proporción de 5:95 (v/v). Una mezcla que contenía 100 μL de los eritrocitos, 100 μL del radical AAPH y 100 μL de la muestra se incubó a 37 °C durante 3 h con agitación continua (30 rpm). Posteriormente, se añadió 1 mL de PBS y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomó como control una suspensión de eritrocitos y AAPH con eritrocitos. El sobrenadante se leyó a 540 nm en una

microplaca de 96 pocillos. El porcentaje de inhibición (% I) se determinó a partir de la ecuación 4:

$$Eq. (4) \% I = \left(\frac{A_{APH1} - HS}{A_{APH1}} \right) \times 100$$

Donde AAPH1= Absorbancia de hemólisis inducida por AAPH; HS=Absorbancia de la muestra.

Identificación de compuestos fenólicos por medio de UPLC-MS

El procedimiento se basó en Hernández-Cruz et al. (2018) con modificaciones. Se utilizó un Cromatografo de líquidos de Ultra Rendimiento (Waters Acquity 2690) (Waters Corp, Singapur) con detector UV unido a un espectrometro de masas SQ Detector 2 simple cuadrupolo (Waters Corp, Milford, MA, USA) gestionado por el software de la consola Acquity con detector de matriz de diodos y un inyector automático. Los extractos fenólicos se filtraron con filtros de 0.22 µL y se inyectaron 20 µL. La columna fue Acquity UPLC BEH C18 2.1 X 50.0 mm, con un tamaño de partícula de 1.7 µm. Las condiciones de funcionamiento fueron fase móvil A (agua + ácido acético 0.1%), fase móvil B (metanol 100%), fase móvil C (acetonitrilo 100%) con un flujo de 0.3 mL/min y un tiempo total de funcionamiento de 14 min con temperaturas de 35 y 20 °C para la columna y la muestra respectivamente. La absorbancia se leyó a 280 nm. Se utilizó un gradiente de elución comenzando con 90% (A), 5% (B) 5% (C); cambiando la proporción al minuto 6 con 76% (A), 12% (B) y 12% (C); al minuto 11 se cambió con 36% (A), 32% (B) y 32% (C), para cambiar el gradiente inicial 90% (A), 5% (B) 5% (C) a 12 min hasta terminar. Se empleó una temperatura de desolvatación de 400 °C y un voltaje en el cono de 30 V. Los datos de espectrometría de masas se adquirieron en modo negativo para iones con un rango 100 a 750 m/z. La asignación de los compuestos se realizó emplando la base de datos de Phenol Explorer (Disponible en: Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>).

FASE 2

Determinación de la bioaccesibilidad y digestibilidad de los compuestos fenólicos del garbanzo en un modelo gastrointestinal *in vitro*

Sistema de simulación *in vitro* del sistema gastrointestinal

Se determinó la bioaccesibilidad a través de un modelo gastrointestinal *in vitro* según lo indica la metodología descrita por Gil-Izquierdo et al. (2002). La prueba de digestibilidad *in vitro* simula las condiciones de la boca, el estómago y el intestino delgado para evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de los garbanzos y sus propiedades antioxidantes. Se dio un total de 15 g de garbanzo cocido a un voluntario sano (que se cepilló los dientes con pasta de dientes, y el último bocado que probó fue 90 min antes de la prueba) y lo masticó 15 veces durante 15 segundos. La muestra se homogeneizó en 10 mL de agua destilada y se acidificó a pH 2 con HCl 6 M. Se añadió a la muestra un volumen de 22.5 mL de pepsina (315 U/ mL preparada en tampón KCl 0.2 M) y 22.5 mL de agua desionizada y se agitó durante 2 h a 80 rpm en un baño de agua (Wise Bath, DAIHAN Scientific, WSB-18) ajustado a 37 °C. La mezcla se neutralizó con NaHCO₃ 1.25 M, y se añadieron 5.625 mL de pancreatina (4.0 mg/mL preparada en solución salina tamponada con fosfato 0.1 M). Tras la homogeneización, la muestra se colocó dentro de una membrana de diálisis (Sigma D9888-100FT; 12000 Dalton de corte) preconditionada (se cortaron 30 cm de la membrana y se dejaron en agua destilada durante 1 día). La membrana se colocó dentro de un tubo de ensayo que contenía aproximadamente 160 mL de solución salina tamponada con fosfato 1 M pH 7.4 y se incubó de nuevo en el baño de agua con agitación (4 h, 37 °C, 80 rpm). Se determinó la actividad antioxidante por DPPH, ABTS, FRAP, AAPH y los fenoles totales antes (inicial) y después de la digestión (dentro y fuera de la membrana) de los extractos de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados de la muestra.

FASE 3

Preparación de la harina de garbanzo

De acuerdo con Cabrera-Soto (2009) a la harina de garbanzo cocida (15 g) se adicionó 30 mL de metanol 80%, las muestras se homogeneizaron 1 h a 100 rpm. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 15 min a 4 °C. El sedimento se secó. A partir de la harina seca se tomaron 250 mg y se disolvió en 25 mL de una solución de agua:etanol 50:50.

Obtención de la microbiota y pool de bacterias presentes en las heces fecales humanas

Se realizó de acuerdo con Chen et al. (2012). Se utilizaron heces fecales de 1 voluntario con su debido consentimiento informado (Anexo 1) y con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Sonora (Anexo 2), el voluntario contó con las siguientes características: Edad entre 25 a 50 años, con un rango de peso de 50 a 80 kg, no fumador, sin consumir antibióticos al menos 6 meses antes de la toma de muestra y sin consumir alimentos ricos en polifenoles al menos 48 h antes de la toma de muestra.

Las muestras se recolectaron y transfirieron inmediatamente a condiciones anaeróbicas para ser procesadas dentro de las siguientes 2 h. Bajo condiciones asépticas se tomaron 100 g de muestra fecal para homogenizarse anaeróbicamente con 110 mL de medio M9 durante 3 min a 200 rpm. Posteriormente las muestras de heces se centrifugaron 3 min a 3000 rpm a 4 °C. El sobrenadante resultante (110 mL) se mezcló con 55 mL de glicerol pre-esterilizado al 35%, se almacenó a -20 °C. A esta muestra la nombramos microbiota intestinal humana.

De la microbiota intestinal humana, se tomaron alícuotas de 100 µL y se sembraron en tubos con caldo de tioglicolato (4 mL) por 24 h en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Una asada de esta fermentación se colocó en placas de agar sangre y MacConkey, y se incubaron durante 5 días en condiciones anaeróbicas a 37 °C. Se tomaron muestras de las bacterias que crecieron y se resembraron las suficientes veces en placas de agar sangre y agar MacConkey para el

aislamiento de unidades formadoras de colonias de bacterias. Se realizaron tinciones Gram para la diferenciación bacteriana, así como pruebas bioquímicas para la identificación de los géneros. Estas bacterias aisladas se mezclaron y se sembraron en agar sangre y agar MacConkey durante 5 días, bajo condiciones anaeróbicas, en el día 5 se realizó un raspado de las bacterias crecidas en toda la placa y se colocó en 100 mL de medio M9, y así sucesivamente con todas las placas en este experimento para su uso posterior.

Interacción de la microbiota intestinal humana y pool de bacterias aisladas de heces humanas con compuestos fenólicos ligados

Se prepararon tres tipos de muestras (Tabla 3). A (Pool de bacterias aisladas), B (Pool de bacterias con garbanzo) y C (Microbiota intestinal humana con garbanzo).

Tabla 3. Clasificación y preparación de las muestras con la microbiota total y bacterias aisladas para el estudio de liberación de compuestos ligados del garbanzo

Muestra	Pool de bacterias aisladas (mL)	Microbiota intestinal humana (mL)	Medio de fermentación M9 (mL)	Harina de garbanzo (10 mg/mL) con compuestos fenólicos ligados (mL)	Agua destilada estéril (mL)
A	100	-	890	-	10
B	100	-	890	10	-
C	-	100	890	10	-
D	-	100	890	-	10
E	-	-	-	10	990

Las muestras se incubaron a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas y se tomaron muestreos a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. En cada muestreo se cuantificaron los compuestos fenólicos totales y se determinó la capacidad antioxidante bajo las técnicas mencionadas, utilizando las muestras A y E como controles para la muestra B, y para la muestra C utilizando las muestras D y E como controles.

Identificación de las enzimas presentes en la interacción de la microbiota intestinal humana y el pool de bacterias con harina de garbanzo

Preparación de las muestras para la identificación de enzimas

Las muestras A, B y C se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C durante 12 h y se centrifugaron 30 min a 13000 x g en una centrifuga Thermo Scientific Sorvall Lynx 400 (Alemania). Los pellets (A, B y C) obtenidos tras la centrifugación de estas muestras se congelaron a -20 °C hasta su uso, mientras que los sobrenadantes (A, B y C) se mezclaron con la cantidad suficiente de EDTA y PSMF (Fenil-metil-sulfunil fluoruro) para obtener una concentración final de 10 y 1 mM de cada inhibidor de proteasas, respectivamente en cada muestra. Las muestras se concentraron mediante diafiltración usando membranas con un tamaño de corte de 10 kDa (Amicon Ultra filters, Amicon Inc. Beverly, MA, EEUU), hasta llegar a un volumen de aproximadamente 5 mL. Los sobrenadantes concentrados (A, B y C), se mezclaron con 30 mL de acetato de amonio 100 mM y se almacenaron toda la noche a -20 °C, para precipitar las proteínas.

Los pellets (A, B y C) se descongelaron y se mezclaron con 15 mL de acetona con 10% de ácido tricloroacético. Se sonicaron (GE-505 Ultrasonic Processor, Sonics & Materials, Inc., Newtown, Connecticut, EEUU) a 35% de amplitud durante 5 ciclos de 3 minutos. Se centrifugaron (Sorvall Lynx 4000, ThermoScientific, San Jose, California, EEUU) a 13,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron toda la noche a -20 °C para precipitar las proteínas.

Las muestras precipitadas en acetona con 10% de ácido tricloroacético (Pellets A, B y C), así como las precipitadas en acetato de amonio 100 mM (sobrenadante filtrado A, B y C) se centrifugaron durante 30 min a 13000 rpm y 4 °C, se decantaron los sobrenadantes y los precipitados se transfirieron a microtubos de 1.5 mL, para realizar 3 lavados con 1 mL de acetona fría. Los tubos se centrifugaron a 13000 x g, 15 min a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Las pastillas se secaron al vacío, utilizando el equipo Vacufuge plus (Eppendorf,

Hamburgo, Alemania). Una vez secas las pastillas se suspendieron en solución de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2%). Se determinó la concentración de las proteínas solubles totales mediante el método de Bradford en microplaca empleando una curva de albúmina sérica bovina en el rango 0-1.0 mg/mL diluida en la solución de rehidratación.

Para obtener un patrón electroforético de las proteínas extraídas de los pellets como de las concentradas a partir de los sobrenadantes filtrados, se separaron 20 µg de proteína de cada muestra mediante SDS-PAGE al 13.5% empleando 2 µL de marcador de amplio rango de peso molecular como referencia (Bio-Rad, Hercules, CA. EEUU), una vez transcurrida la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie y se digitalizó en un fotodocumentador (ChemiDoc, Bio-Rad).

Identificación de proteínas mediante análisis proteómico tipo shotgun

Para el análisis tipo shotgun, las proteínas de las 6 condiciones (50 µg) se resolvieron en una migración corta de aproximadamente 4 mm en un gel SDS-PAGE al 13.5%. El gel se tiñó con azul de Coomassie y las bandas de proteína se escindieron de los geles con la ayuda de un bisturí. Posteriormente se destiñeron, se redujeron con DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM y se alquilaron con Iodoacetamida 55 mM y finalmente se digirieron durante toda la noche a 37 °C con tripsina grado espectrometría de masas (Pierce, Thermo-Fisher Scientific, San Jose CA, EE UU) de acuerdo con lo reportado previamente por Maldonado-Cervantes et al. (2014). Finalmente, los péptidos se secaron empleando un evaporador (Vacufuge plus, Eppendorf).

Los péptidos obtenidos tras la digestión triptica se desalaron utilizando cromatografía de fase reversa mediante extracción en fase sólida (C18, SepPack, Waters Milford, MA, EE UU). Para ello, cada muestra se suspendió en 1 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y se homogenizó mediante vórtex por 5 min. Después, se acondicionó la columna adicionando 2 mL de acetonitrilo al 100% seguido de 2 mL de acetonitrilo al 50% los cuales fueron desechados. Enseguida se equilibró la columna añadiendo 2 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y una vez desechado se cargó la muestra (Péptidos digeridos) en la columna y se filtró 2 veces. Se lavó la

columna con 2 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y finalmente, se eluyeron los péptidos de la columna agregando 1.5 mL de acetonitrilo al 50% con ácido trifluoroacético al 0.1% y se recolectó la muestra en un tubo microtubo Eppendorf. Los péptidos desalados se secaron empleando un evaporador (Vacufuge plus, Eppendorf).

Los péptidos obtenidos de cada muestra se analizaron de manera independiente por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) de la siguiente manera: Se suspendieron en una solución de acetonitrilo al 10% con 0.1% de ácido fórmico y se separaron en un cromatógrafo de líquidos ultra desempeño (Dionex Ultimate 3000, RSLCnano UHPLC system, Thermo Fisher Scientific, San José CA, EE UU) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Q-Exactive Plus high resolution mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se atraparon en una pre-columna (C18 PepMap 100, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m x 5 mm) y posteriormente se separaron mediante un gradiente de elución de 250 minutos en una columna capilar a un flujo de 250 nL/min (EASY Spray Column, PepMap RSLC, C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m x 150 mm). Las fases móviles fueron las siguientes: A, 0.1% ácido fórmico en agua y B, 90:10 (v/v) acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido fórmico. El espectrómetro de masas se operó en modo positivo mediante un programa de adquisición dependiente de datos. En el modo MS se filtraron los iones con un rango de 300-2000 m/z. Los 10 iones más intensos de cada escaneo en modo MS con estados de carga de 2 y superiores se aislaron con una ventana 1 m/z en el cuadrupolo y se fragmentaron con una energía normalizada de colisión de 27%. La masa/carga de los iones precursores se midió a una resolución de 70000 (a 200 m/z) mientras que la de los iones fragmento se midió a una resolución de 17500.

La identificación de las proteínas se realizó empleando el software Max Quant (v 1.6.10.43) y las siguientes bases de datos de proteínas: Swiss-Prot bacterias (334210 secuencias); Proteoma de garbanzo (31214 secuencias); Esterasas, glucosidasas y xylanases de los géneros *Bacteroides*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Veillonella* de Swiss-Prot (16370 secuencias). Usando los siguientes parámetros: Tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte, la tolerancia de masa para los iones precursores y para sus iones fragmento fue de 20 ppm. Se especificó la carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija, mientras que la oxidación de las metioninas y la acetilación del N-terminal de las proteínas se

especificaron como modificaciones variables. Se consideraron como proteínas identificadas aquellas para las que se obtuvieron al menos dos péptidos y un valor FDR (False Discovery Rate) menor a 0.01.

Análisis estadístico

Se realizaron una serie de análisis estadísticos (diseño multifactorial) para cada uno de los objetivos, obteniendo un ANOVA y en caso de que fuera necesario se aplicó la prueba de Tukey para ver las diferencias significativas ($p < 0.05$) utilizando el software Statgraphics Centurion XV. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE 1

Caracterización fisicoquímica del garbanzo (análisis proximal)

Las diferencias de composición entre el garbanzo crudo y el cocido son importantes porque permiten conocer los componentes que se modifican o cambian tras la cocción. La tabla 4 muestra la composición proximal de estas muestras. En general, los hidratos de carbono son el grupo constitutivo mayoritario de las legumbres-granos. El contenido en hidratos de carbono mostró diferencias significativas entre los garbanzos crudos (64.40%) y los cocidos (68.32%). Estos valores concuerdan con los encontrados en otros autores que están en un rango de 53.5 a 71.4% (Tabla 5). La humedad y la ceniza presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las muestras crudas y cocidas. Por el contrario, el contenido proteico, la grasa y la fibra no mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre el garbanzo crudo y cocido.

Tabla 4. Composición proximal de garbanzo crudo y cocido

Composición	Crudo (%)	Cocido (%)
Carbohidratos*	64.40 ^a ± 0.50	68.32 ^b ± 0.34
Humedad*	5.96 ^a ± 0.10	47.28 ^b ± 0.07
Cenizas	2.80 ^a ± 0.47	1.75 ^b ± 0.04
Proteína	19.16 ^a ± 0.51	18.38 ^a ± 1.98
Grasa	6.23 ^a ± 0.07	5.35 ^a ± 0.08
Fibra	7.41 ^a ± 0.97	7.20 ^a ± 0.82

*Muestra húmeda. Media ± Desviación estándar con base en tres réplicas.
Letras diferentes en la fila indican que son significativamente diferentes ($p<0.05$)

La humedad fue mayor en el garbanzo cocido (47.28%) que en el crudo (5.96%) porque el garbanzo obtuvo agua en el proceso cuando fue remojado. Los valores de humedad del garbanzo crudo están en el rango de los reportados en las referencias (5.4-10.6%) (Tabla 5). En las

muestras cocidas, algunos estudios reportaron 56.2-100% (Tabla 5), donde estos valores son más altos a los obtenidos en este estudio. Probablemente, el contenido de humedad puede variar considerablemente debido al tiempo de remojo, a la cocción e incluso a la variedad del garbanzo, tipo de suelo, forma de cultivo y condiciones de manejo para su desarrollo (Herrera-Flores et al., 2014; Sing et al., 1990; Patané et al., 2004). Por otra parte, la disminución del contenido de cenizas, grasa y proteína puede verse afectada por el remojo o la temperatura. El contenido de cenizas es una medida de los minerales totales, probablemente las pérdidas de minerales se debieron a la lixiviación en las aguas de remojo y cocción (Ouazib et al., 2016). Resultados similares se observaron en el estudio de Marconi et al. 2000, en el que se observó una reducción de las cenizas en las judías y los garbanzos tras la cocción. En general, el valor de las cenizas de los garbanzos crudos está en un rango de 2.5 a 3.8% (Tabla 5). Según la Tabla 1, la grasa del garbanzo cocido (5.35%) fue inferior a la de la muestra cruda (6.23%). La cantidad de grasa de la legumbre puede ser importante en la formación del complejo amilosa-lípido y tener un buen comportamiento en la gelatinización del almidón durante la cocción, fenómeno que tiende a limitar la biodisponibilidad del almidón (Silva-Cristóbal et al., 2010). Comparando con lo obtenido por otros autores en diferentes cultivares en garbanzo cocido (0.6 – 6.4%) (Tabla 5) en nuestro estudio está en este rango, y en cuanto al contenido de grasa del garbanzo crudo (5.30%) también este estudio se encuentra en este rango (3.1-11.1 %) (Tabla 5). En cuanto al contenido de proteína, los autores presentan en el garbanzo crudo de 18.3-51.94% (tabla 5). En el presente estudio, la cantidad de proteína del garbanzo crudo (19.16%) fue alta. Esta proteína disminuyó levemente después de la cocción (18.55%), probablemente debido a un efecto de solubilización de las proteínas de las semillas en el agua (Pujolá et al., 2007). Sin embargo, la cantidad de proteína que queda en los garbanzos cocidos se sigue considerando alta en comparación con otras legumbres crudas con los mismos valores.

Por último, la fibra se refiere a la cuantificación de los elementos fibrosos de la pared de la célula vegetal. La cantidad de fibra de los garbanzos crudos fue del 7.41%, y no hubo diferencias significativas en su contenido tras la cocción. Esta cantidad está en el rango reportado por otros autores (4.62 -16.20%) (tabla 5) en el garbanzo tipo Kabuli.

Tabla 5. Composición proximal de garbanzo crudo y cocido en diferentes variedades de diversos autores

Referencia	Carbohidratos %	Humedad %	Cenizas %	Proteínas %	Grasas %	Fibra %
He et al., 2019	Luna: 67.4 Leader: 65.4 Orion: 61.8 Consul:65.2 Amit:66.8	Luna: 5.4 Leader: 8.6 Orion: 9.2 Consul:10.7 Amit:5.2	Luna: 2.5 Leader: 3.0 Orion: 3.2 Consul:2.9 Amit:3.4	Luna: 18.3 Leader: 20.9 Orion: 23.6 Consul:18.7 Amit:20.2	Luna: 7.2 Leader: 6.4 Orion: 5.9 Consul:4.6 Amit:4.1	Luna: 9.3 Leader: 9.3 Orion: 5.3 Consul:8.5 Amit:5.5
Ferreira et al., 2019	63.4	-	3.3	18.4	5.8	-
Summo et al., 2019	57.15	-	3.48	22.06	5.1	12.2
Herrera-Flores et al., 2014	-	-	Costa:3.0 Blanoro:2.8	Costa 51.94 Blanoro: 47.1	Costa:5.7 Blanoro: 5.6	-
HeirasPalazuelos et al., 2013	68.7	-	2.9	23.5	6.9	-
Polo-Chavez et al., 2012	59.8	10.6	3.2	21.3	6.34	4.62
Muy et al., 2011	9.8*	77.5*	0.8*	7.8*	0.6*	3.3*
Aguilera-Gutiérrez et al., 2009	71.4 78.4 *	-	-	-	3.1 3.8 *	-
Han et al., 2008	-	-	3.06	20.5	6.1	3.4
Marconi et al., 2000	-	73.7*	3.8 0.93*	22.9 2.8*	6.4*	-
Iturralde et al., 2016	-	100	-	-	-	-
Kumar et al., 2019	53.5 58.4	56.2* 59.1*	- -	31.5 29.3	10.1 11.1	16.2 16.1

*Muestra de garbanzo cocida

Almacenamiento en atmósferas modificadas (ATM)

Las atmósferas modificadas pueden ayudar a preservar diferentes compuestos, especialmente aquellos con importancia bioactiva de los alimentos, como los compuestos fenólicos que poseen capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante determinada con DPPH (Figura 11) y ABTS (Figura 12), así como los compuestos fenólicos totales (Figura 13) del garbanzo cocido bajo atmósferas de aire (control), N₂ y CO₂, fueron monitorizados durante 0, 25 y 50 días a diferentes temperaturas en cada fracción fenólica (libre, conjugada y ligada). En general, se observa que todas las muestras bajo atmósferas de nitrógeno se conservan mejor que en el resto de las atmósferas utilizadas. La capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos fueron más estables a 4 y -20 °C durante el tiempo de almacenamiento bajo la atmósfera de nitrógeno.

Inicialmente, la capacidad antioxidante determinada por DPPH (Figura 11) de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados fue de 19.76, 35.54 y 56.52% de inhibición, respectivamente. En las mismas muestras, en ABTS (Figura 12), partían de un 19.15, 26.3 y 92.17% de inhibición, respectivamente. Estas diferencias podrían deberse al contenido fenólico caracterizado por sus propiedades antioxidantes. La cantidad de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados (Figura 13) fue de 22.04, 19.43 y 105.6 mg EAG/100 g de la muestra, respectivamente. Los fenoles ligados son los de mayor cantidad, posiblemente porque están más protegidos dentro de la matriz alimentaria al estar unidos a polisacáridos como la pectina, la celulosa y la hemicelulosa. Esto podría explicar el mayor potencial antioxidante de los fenoles unidos a ambos radicales. Sin embargo, cada radical puede presentar diferentes afinidades por la muestra y, en consecuencia, dar valores diferentes a pesar de ser la misma muestra. En este contexto, el ABTS reacciona más con compuestos hidro y lipofílicos y con un donante de átomos de hidrógeno (Prior et al., 2005; Perez-Perez et al., 2017). Mientras que el DPPH tiene menos afinidad por compuestos que contienen anillos aromáticos con sólo grupos hidroxilos (Von Gadov et al., 1997; Yokozawa et al., 1998) y más afinidad por compuestos lipofílicos (Sharma et al., 2009). El Folin-Ciocalteu es un método que además de reaccionar con polifenoles, puede reaccionar también con otros compuestos que pueden ser reducidos (Andrés-Lacueva et al., 2010).

La degradación de la capacidad antioxidante y de los compuestos fenólicos es más evidente en atmósferas de aire y de CO₂ desde el día 25 al 50, mostrando una degradación máxima de aproximadamente 87.84% en estas condiciones. Mientras que en la atmósfera de N₂, la degradación máxima fue de 32.8% en el día 50. Esto podría deberse a que el N₂ sustituye al O₂ del interior del contenedor, evitando la degradación oxidativa en el alimento para mantener los altos niveles de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en el garbanzo durante más tiempo (Park et al., 2019; Shen et al., 2019). Por lo tanto, siendo el N₂ un gas totalmente inerte y extraordinariamente poco soluble en agua y grasas, lo convierte en un producto ideal para la conservación, evitando la oxidación y la futura contaminación en los alimentos y bebidas. Por tanto, la atmósfera de N₂ es la más adecuada para preservar tanto la capacidad antioxidante como los compuestos fenólicos del garbanzo cocido durante su almacenamiento.

Por otro lado, según los resultados obtenidos durante el almacenamiento del garbanzo, las muestras en atmósfera de N₂ a -20 °C conservan casi en su totalidad los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante. Sin embargo, se realizó un análisis proximal de estas condiciones para determinar si había cambios en el contenido de nutrientes hasta los 50 días de almacenamiento (Tabla 6). Se puede observar que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las cantidades iniciales y hasta los 50 días en hidratos de carbono, cenizas, proteínas, grasas y fibra. Resultados similares fueron encontrados por Kumar et al. (2019). Por lo tanto, este garbanzo puede considerarse un alimento de buena calidad nutricional por su alto contenido en proteínas, fibra y grasa, con una cantidad total de minerales aceptable para las legumbres (FAO 2017).

Tabla 6. Análisis químico proximal de harina de garbanzo en el día 0 y el día 50 en atmósfera de N₂ a -20 °C.

Composición (%)	Día 0	Día 50
Carbohidratos	68.32 ^a ± 0.34	67.29 ^a ± 0.65
Cenizas	1.75 ^a ± 0.04	2.05 ^a ± 0.03
Proteína	18.38 ^a ± 1.98	17.18 ^a ± 2.06
Grasas	5.35 ^a ± 0.08	5.45 ^a ± 0.02
Fibra	7.20 ^a ± 0.82	7.30 ^a ± 0.60

Desviación estándar con base en tres réplicas Las medias en la misma línea con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

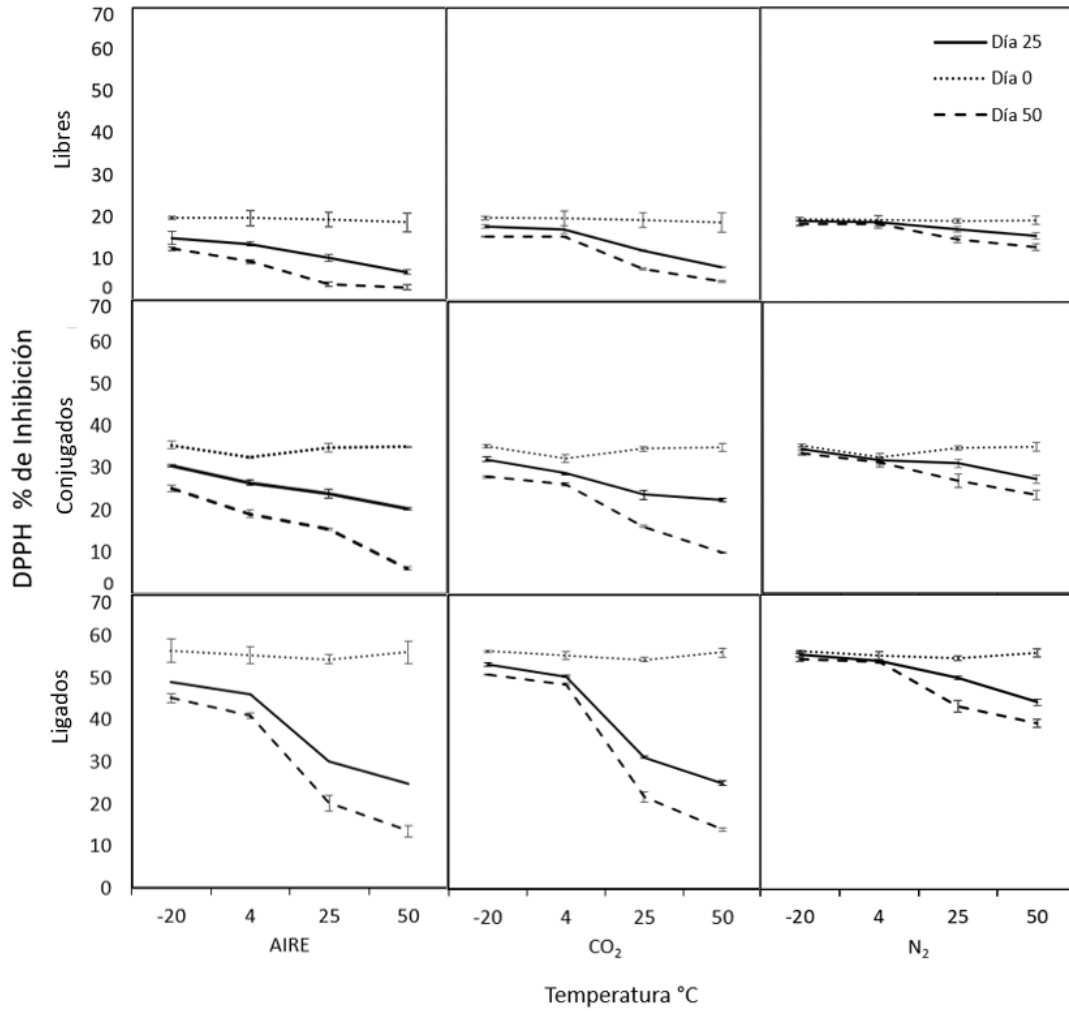


Figura 11. Inhibición del radical DPPH de garbanzos sometidos a diferentes atmósferas hasta 50 días de almacenamiento.

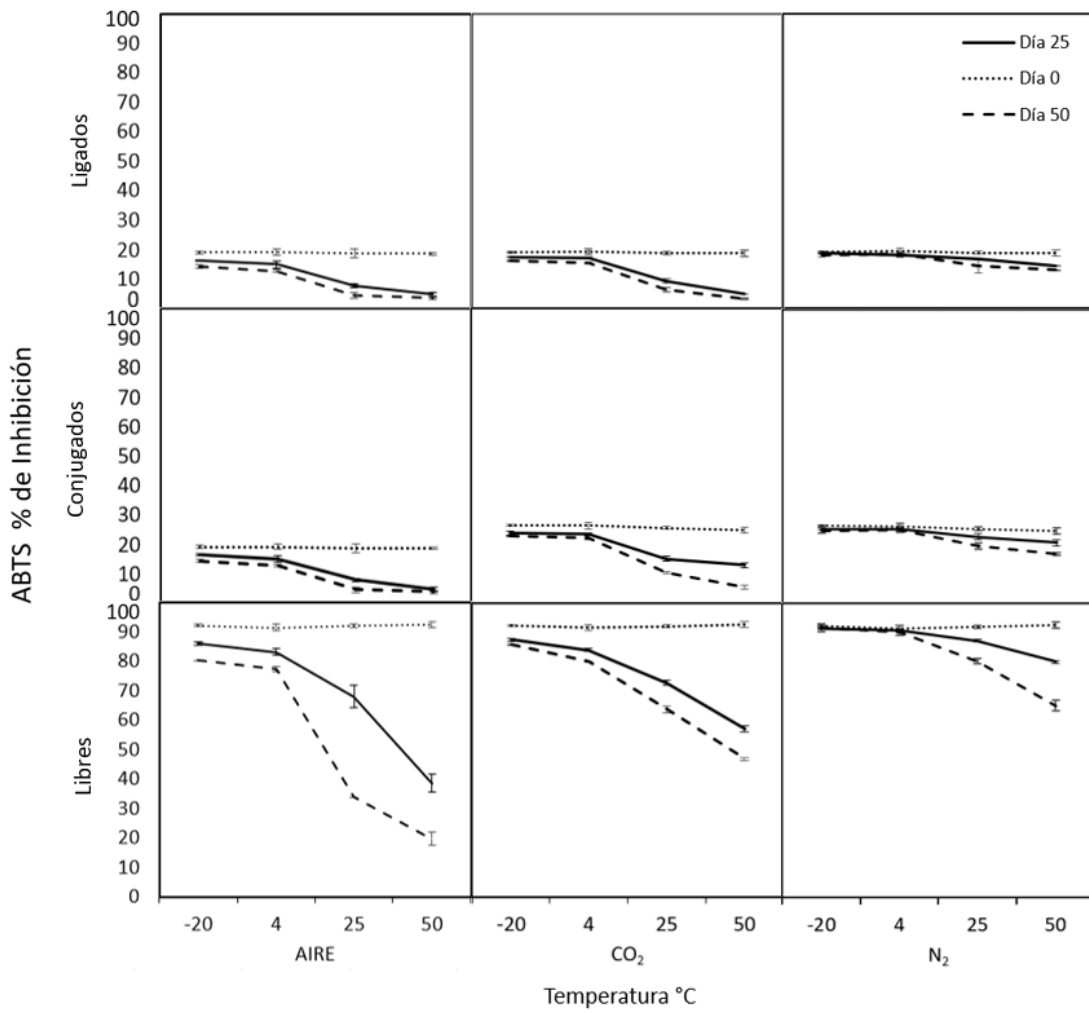


Figura 12. Inhibición del radical ABTS de garbanzos sometidos a diferentes atmósferas hasta 50 días de almacenamiento.

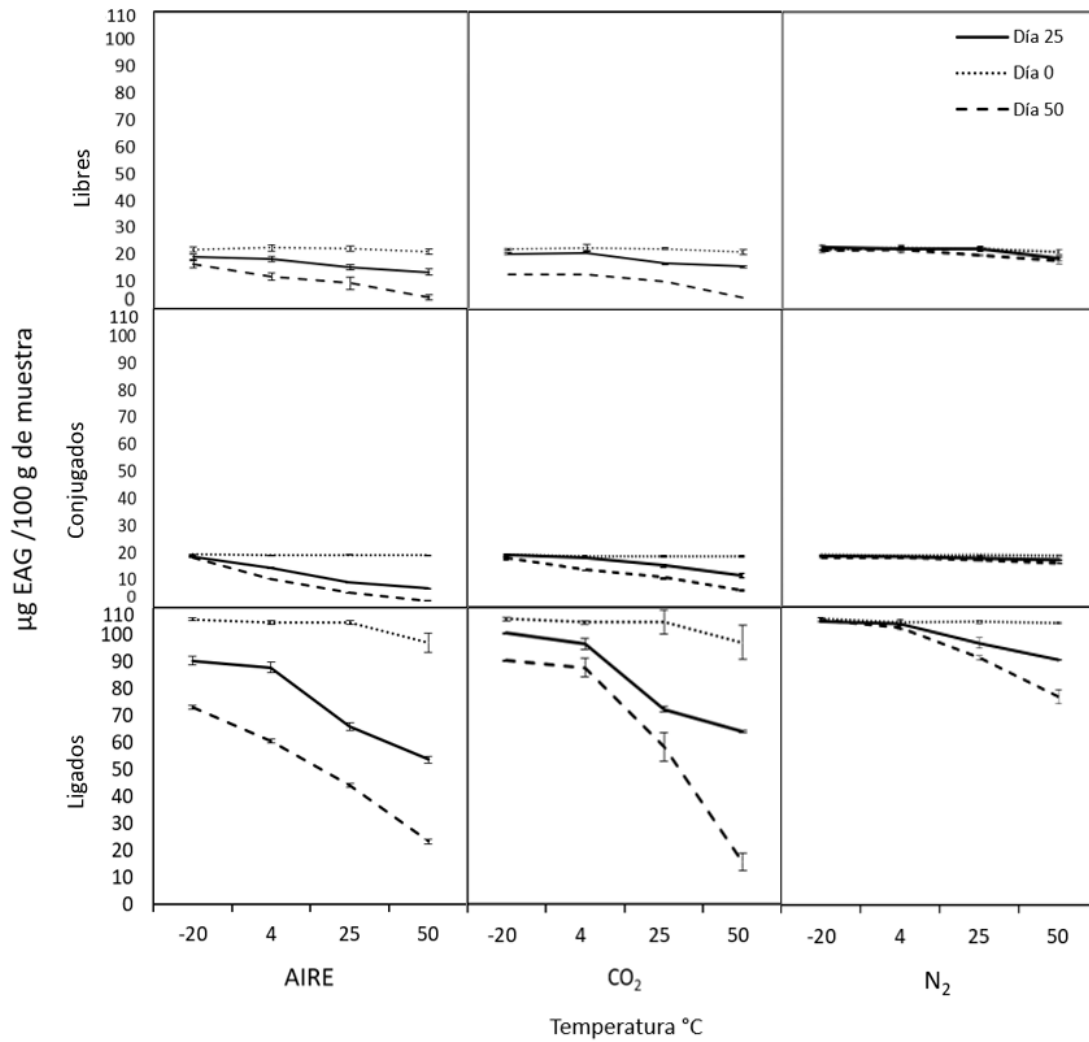


Figura 13. Cuantificación de compuestos fenólicos de garbanzos sometidos a diferentes atmósferas hasta 50 días de almacenamiento.

Calidad Tecnológica

El proceso de hidratación (remojo) de las legumbres es importante porque tiene varias funciones: a) Reduce el tiempo de cocción; b) Permite iniciar la actividad enzimática que las hace más digeribles y c) Es necesario para ablandarlas y que puedan cocinarse y comerse fácilmente. En la figura 14 se muestra la absorción de agua y la textura del garbanzo. Se observa que el comportamiento de sorción es de tipo logarítmico con un contenido de agua creciente durante el tiempo de remojo. Este aumento se produjo hasta las 8 h, probablemente debido al llenado de los capilares libres y de los espacios intermicelares en la cubierta del grano y en el hilio (Johnny et al., 2015). De 8 a 22 h de remojo, la absorción de agua no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). Según otras investigaciones, el punto de saturación de la absorción de agua en el garbanzo se ha reportado entre 4 y 24 h (Iturralde-García et al., 2016; Romero-Baranzini et al., 2014; Favela-Gomez et al., 2017). En cuanto a la textura, la dureza del grano fue disminuyendo (de 0.69 N a 0.28 N), sin diferencias significativas después de 6 horas de remojo. Un comportamiento similar fue observado por Kumar et al. (2019) donde reportaron en dos variedades diferentes de garbanzo crudo valores de 0.15 N y 0.16 N. Por lo tanto, la determinación de la absorción de agua y la dureza (textura) durante el remojo fue un indicador del momento (8 h) en que el grano absorbe más agua con menor dureza, pudiendo reducir el tiempo de cocción.

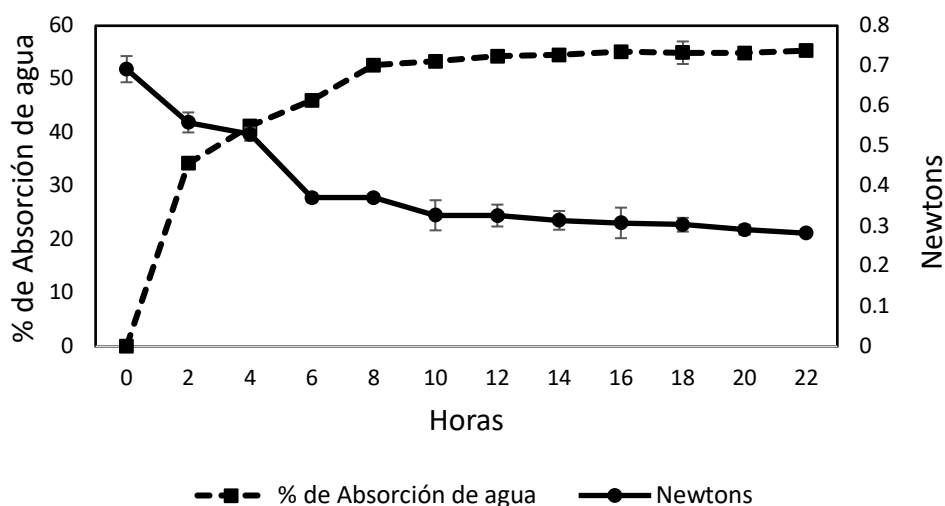


Figura 14. Textura del garbanzo expresada en Newtons y absorción de agua del garbanzo.

Entre las diversas características del garbanzo de alta calidad, el color es una de las más importantes ya que influye en la selección de nuevas variedades mejoradas de garbanzo en los centros de investigación experimental y también en el precio en el mercado internacional (Romero-Baranzini et al., 2014). Actualmente no existe una clasificación de los colores que representan el grano del garbanzo como referencia objetiva a la hora de su comercialización. Hasta ahora ha sido la percepción del consumidor. En la Tabla 7 se muestran los resultados de color entre el garbanzo crudo y cocido. El parámetro luminosidad (L^*) fue mayor en el garbanzo crudo debido a la oxidación que provoca un oscurecimiento de la muestra y, en consecuencia, una mayor luminosidad en la muestra cocida. En el diagrama de cromaticidad, el valor de a^* del garbanzo cocido fue mayor que el del garbanzo crudo, lo que significa que el valor tiene tonos más cercanos a los rojos que la muestra cruda; por lo tanto, es el garbanzo cocido más intenso que el crudo. Lo mismo ocurre con el parámetro b^* , donde el garbanzo cocido tiene un valor más alto, que corresponde a un tono amarillento comparado con el garbanzo crudo. Un comportamiento similar fue reportado por Reyes-Moreno et al. (2002). Sin embargo, los colores del garbanzo pueden variar considerablemente. Algunos estudios han reportado diferencias en el color entre el garbanzo Desi y el Kabuli, e incluso dentro de sus propias variedades (Kumar et al., 2019; Maninder et al., 2005).

Tabla 7. Parámetros de color de garbanzo Blanoro crudo y cocido

	L	a*	b*
Crudo	60.44 ± 3.5 ^a	6.98 ± 0.4 ^a	17.74 ± 1.25 ^a
Cocido	55.45 ± 3.81 ^b	8.63 ± 0.62 ^b	22.4 ± 1.9 ^b

Media ± Desviación estándar con base en tres réplicas. Letras diferentes en la misma columna indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

El valor ΔE (7.66 ± 3.58) es superior a 5 lo que significa que existe diferencia de color entre el garbanzo cocido y el garbanzo crudo (ISO 12647-2). Reyes et al. (2002), reportan valores de ΔE superiores a 5 en harinas de garbanzo cocido y crudo, lo cual coincide con el resultado de este trabajo.

Capacidad antioxidante de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Los resultados de la digestión del garbanzo se muestran en la Tabla 8. En primer lugar, antes del proceso de digestión *in vitro*, se comparó la capacidad antioxidante y la cantidad de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados del garbanzo crudo y cocido. Se observó una disminución de las cantidades de compuestos fenólicos (libres 58.8%, conjugados 28.7% y ligados 26.9%) después de la cocción. De acuerdo con De Santiago et al. (2018) y Mtolo et al. (2017) aplicar un tratamiento térmico más prolongado (más a 15 min) al alimento tiene consecuencias estructurales como cambios en la matriz del alimento, y puede ocurrir una disminución de los compuestos fenólicos. Este mismo comportamiento se presentó en la capacidad antioxidante (DPPH: 23.6-51.2%, ABTS: 44.2-52.5%, FRAP: 33.8-59.5, y AAPH: 44.0-53.9%). Esta tendencia se produce cuando los compuestos fenólicos son los responsables de conferir la propiedad antioxidante a la muestra. Para comprobarlo, se determinaron correlaciones de Pearson (Anexo 3). Los coeficientes de correlación de Pearson entre los compuestos fenólicos (conjugados y ligados principalmente) se observan fuertemente ($r > 0.700$) con la capacidad antioxidante en todas las técnicas utilizadas, excepto para la fracción fenólica libre, que mostró una correlación moderada ($r = 0.449$) con el FRAP en el garbanzo crudo. El FRAP se basa en el poder reductor de un antioxidante (en este caso, los compuestos fenólicos del garbanzo) del ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}). Esta transferencia de electrones es directamente proporcional a la actividad antioxidante. Así, la correlación moderada indica que los compuestos fenólicos libres no confieren totalmente este transporte de electrones en el garbanzo crudo.

Es importante mencionar que el DPPH y el ABTS son radicales sintéticos. Sin embargo, dan una idea del posible comportamiento de los compuestos fenólicos del garbanzo con los radicales en el organismo. Por otro lado, el AAPH es un generador de radicales libres que induce la oxidación de la membrana lipídica en el eritrocito. Esta técnica mide directamente el efecto protector de los compuestos fenólicos del garbanzo contra el daño oxidativo de los eritrocitos (González-Vega et al., 2021). En este contexto, los compuestos fenólicos ligados (Tabla 8) mostraron la mayor protección oxidativa en el garbanzo crudo (146.0 mg EAG/100 g) y cocido

(106.6 mg EAG/100g de muestra) con este ensayo. Estos compuestos fenólicos ligados presentaron la mayor capacidad antioxidante (garbanzo crudo y cocido) en todas las técnicas antioxidantes utilizadas. Sin embargo, durante el proceso de digestión, el comportamiento de estos compuestos es diferente. Probablemente porque los compuestos fenólicos unidos están fuertemente unidos a la celulosa, hemicelulosa y pectina de la matriz del garbanzo (Shahidi et al., 2016), la bioaccesibilidad de estos compuestos es muy baja desde la boca (alfa-amilasa) hasta el intestino delgado (pancreatina). Por lo tanto, estos compuestos deben pasar al intestino grueso, donde serán metabolizados por la microbiota intestinal produciendo fenoles de menor peso molecular con mayor absorción. En consecuencia, la capacidad antioxidante de estos compuestos aumentará porque los grupos funcionales de los compuestos fenólicos estarán más expuestos (Perez-Perez et al., 2018).

Por otra parte, los compuestos fenólicos libres y conjugados podrían ser hidrolizados por las enzimas digestivas, aumentando su bioaccesibilidad y, en consecuencia, su capacidad antioxidante durante cada paso de la digestión. Como estos compuestos son más bioaccesibles, tienen más posibilidades de ser absorbidos a través del intestino (dentro de la membrana) y de pasar a la vena porta (fuera de la membrana) para ser transportados a las diferentes células del organismo. Por esta razón, podemos observar que al consumir garbanzos cocidos, alrededor del 30% de los compuestos fenólicos libres y el 45% de los compuestos conjugados pueden ser absorbidos a través del intestino confiriendo una buena capacidad antioxidante (Tabla 8). Hay que tener en cuenta que en este estudio *in vitro* no hay transporte a través de la membrana ni de la microbiota, por lo que estos porcentajes podrían aumentar probablemente con una digestión normal.

Algunos estudios mostraron un comportamiento similar relacionado con la capacidad antioxidante y la cantidad de fenoles que nuestro estudio (Koehnlein et al., 2016; Lucas-González et al., 2018). Sin embargo, otros estudios informaron de que en FRAP no había diferencias significativas entre la muestra inicial y la muestra digerida *in vitro* (Mtolo et al., 2017). En cuanto a la evaluación del efecto protector de los eritrocitos humanos contra el AAPH, hay pocos estudios sobre este tema en las legumbres. Zhao et al. (2017) reportaron con este análisis fracciones fenólicas libres (3.46 – 44.27% de inhibición) y ligadas (0.29 – 8.56% de

inhibición) de diferentes cereales, al contrario de nuestros resultados ya que obtuvimos compuestos fenólicos ligados en mayor proporción con la mayor capacidad antioxidante.

Tabla 8. Capacidad antioxidante y cuantificación de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión *in vitro*.

	Crudo	Cocido	Boca* (Alfa-amilasa)	Estómago* (Pepsina)	Intestino delgado*	
					(Pancreatina) Dentro de la membrana	(Vena porta) Afuera de la membrana
DPPH**						
Libre	^{aA} 16.8 ± 1.5	^{bA} 8.2 ± 0.5	^{cA} 0.6 ± 0.1	^{deA} 3.7 ± 1.2	^{eA} 4.9 ± 0.4	^{dA} 3.0 ± 0.4
Conjugado	^{aA} 17.3 ± 0.7	^{bA} 9.7 ± 0.3	^{cB} 0.17 ± 0.0	^{dA} 2.5 ± 0.0	^{eA} 6.7 ± 1.0	^{eB} 5.0 ± 1.0
Ligado	^{aB} 35.1 ± 3.7	^{bB} 26.8 ± 1.2	^{cB} 0.0 ± 0.0	^{dB} 9.8 ± 1.7	^{eB} 16.2 ± 0.5	^{cC} 0.0 ± 0.0
ABTS**						
Libre	^{aA} 15.6 ± 1.4	^{bA} 8.7 ± 0.2	^{cA} 1.9 ± 0.6	^{cA} 3.2 ± 1.1	^{cA} 8.3 ± 0.1	^{bA} 6.7 ± 0.1
Conjugado	^{aA} 19.6 ± 4.3	^{bA} 9.3 ± 0.0	^{cB} 2.3 ± 0.0	^{bcA} 6.9 ± 2.4	^{bcA} 8.3 ± 0.9	^{bcAB} 5.3 ± 1.2
Ligado	^{aB} 41.8 ± 2.1	^{bB} 21.7 ± 0.2	^{cC} 0.75 ± 0.0	^{dA} 8.1 ± 2.1	^{dB} 11.1 ± 0.1	^{cB} 2.6 ± 0.1
FRAP**						
Libre	^{aA} 18.7 ± 0.2	^{bA} 7.2 ± 0.1	^{cA} 4.5 ± 0.2	^{dA} 3.3 ± 0.4	^{eA} 6.3 ± 0	^{cA} 5.1 ± 0.0
Conjugado	^{aB} 66.2 ± 0.2	^{bB} 41.0 ± 3.1	^{cB} 3.4 ± 0	^{dB} 11.7 ± 0.1	^{eB} 32.0 ± 0.2	^{fB} 28.2 ± 0.5
Ligado	^{aC} 71.2 ± 0.1	^{bC} 30.2 ± 0.2	^{cB} 3.6 ± 0.1	^{dC} 6.8 ± 1.1	^{eC} 13.5 ± 0.1	^{cC} 3.9 ± 0.1
AAPH***						
Libre	^{aA} 11.3 ± 1.3	^{bA} 6.1 ± 1.7	^{cA} 0.5 ± 0.0	^{cdA} 2.6 ± 0.7	^{dbA} 5.1 ± 0.7	^{dbA} 4.6 ± 1.5
Conjugado	^{aB} 67.7 ± 4.0	^{bB} 31.9 ± 1.6	^{cB} 3.8 ± 0.4	^{dB} 11.0 ± 0.4	^{bB} 30.6 ± 0.7	^{eB} 19.0 ± 0.4
Ligado	^{aC} 76.8 ± 1.6	^{bC} 43.0 ± 0.7	^{cC} 2.5 ± 0.4	^{dC} 7.4 ± 0.7	^{eA} 9.7 ± 0.7	^{fC} 0.0 ± 0
Compuestos fenólicos ****						
Libre	^{aA} 57.5 ± 5	^{bB} 23.7 ± 1	^{eA} 3.0 ± 0	^{dA} 5.5 ± 0.0	^{cA} 7.7 ± 0.6	^{cA} 7.1 ± 0.1
Conjugado	^{aB} 27.2 ± 0	^{bA} 19.4 ± 0	^{cB} 1.8 ± 0	^{dA} 5.5 ± 0.3	^{eA} 9.0 ± 1.1	^{eA} 8.8 ± 0.1
Ligado	^{aC} 146.0 ± 4	^{bB} 106.6 ± 4	^{cC} 4.2 ± 0.5	^{dB} 13.9 ± 2.6	^{eB} 39.3 ± 0.6	^{fB} 1.4 ± 0.0

Desviación estándar basado en tres réplicas. Diferentes letras mayúsculas en la fila indica que existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas en las columnas indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en cada experimento de capacidad antioxidante.

*Las cuantificaciones fueron en base a garbanzo cocido. **Reportado en nmol ET/g de muestra, Trolox se utilizó como estándar.

***Reportado en mg EAG/100 g de muestra, se utilizó ácido gálico como estándar.

Identificación por UPLC-MS de compuestos fenólicos en los extractos de garbanzo liberados a través del sistema gastrointestinal *in vitro*

Se identificaron compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados mediante UPLC-MS (Anexo 4) en garbanzos crudos y cocidos (Tabla 9) y se compararon con la base de datos sobre el contenido de polifenoles en los alimentos (Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>). Se identificaron doce compuestos. El compuesto mayoritario de los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados, tanto en el garbanzo crudo como en el cocido, fue el enterodiol (46.4-67.42%), un compuesto lignano con varias propiedades beneficiosas como antioxidante y como inhibidor de algunos tipos de cáncer (Prasad, 2000; McCann et al., 2003; Horn-Ross et al., 2003; Shin et al., 2019). El resto de los compuestos se encuentran en cantidades variables y pertenecen a diferentes clases de fenólicos: a) Lignanos: Gomisina D (5.81-10.33%) y Anhidrosecoisolariciresinol (12.43-12.78%); b) Flavonoides: Pelargonidina 3,5-O-diglucósido (1.95-8.67%), Hesperetina 3',7-O-diglucurónido (5%), 6-Geraniinaringenina (7.46-7.73%), Isorhamnetina (1.55%) y Floretina 2'-O-glucósido (1.67%); c) Ácidos fenólicos: *p*-Cumaroil glucosa (2.90%) y ácido 3,4-Diferuloilquinico (6.61%); d) Otros polifenoles: Hidroxitirosol 4-O-glucósido (3.08-5.62%) y 1,4-Naftoquinona (3.54%). Se observa la presencia de más variedad de compuestos fenólicos de tipo flavonoide. Esto es característico de la composición fenólica de los cereales y las legumbres (Xiang et al., 2019; Xu et al., 2019).

Por otro lado, hay compuestos fenólicos en forma glicosídica, especialmente en compuestos fenólicos libres. Von Gadov et al. (1997) indicaron que la eficacia antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación, pero éste disminuye con la presencia de un enlace a una glucosa. Esto puede explicar la baja capacidad antioxidante observada en los compuestos fenólicos libres en comparación con los compuestos ligados y conjugados. Además, se ha comprobado que los compuestos fenólicos con mayor número de sustituyentes, principalmente hidroxilos, y aquellos con menor número de sustituyentes metoxi, se degradan más fácilmente por efecto de la temperatura (Liazid et al., 2007). Esto explica la disminución de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en el garbanzo cocido en comparación con el crudo.

Tabla 9. Compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados, identificados por UPLC-MS en garbanzo crudo y cocido

Muestra	No.	TR (min)	% de área	Compuesto	Masa observada <i>m/z</i>	Masa Exp. ^a (Da)	Masa Teor. ^b (Da)	Delta de Masa (Da)	Fórmula Molecular
Extracto de garbanzo crudo / Libre	1	0.63	6.40	Gomisina D	529.33	530.33	530.21	0.12	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	2	0.99	46.40	Enterodiol	301.33	302.33	302.15	0.18	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
	3	9.71	3.08	Hidroxitirosol 4- <i>O</i> -glucósido	315.18	316.18	316.12	0.06	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	4	9.91	8.67	Pelargonidina 3,5- <i>O</i> -diglucósido	629.35	630.35	630.13	0.22	C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₅
	5	10.06	3.54	1,4-Naftoquinona	157.18	158.18	158.04	0.14	C ₁₀ H ₆ O ₂
	6	11.43	2.90	<i>p</i> -Coumaroil glucosa	325.19	326.19	326.10	0.09	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
Extracto de garbanzo crudo / Conjugado	1	0.55	7.46	6-Geraniilnaringenina	407.27	408.27	408.19	0.08	C ₂₅ H ₂₈ O ₅
	2	0.63	9.72	Gomisina D	529.33	530.33	530.21	0.12	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	3	0.99	57.12	Enterodiol	301.33	302.33	302.15	0.18	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
	4	9.71	1.55	Isorhamnetina	315.11	316.11	316.05	0.06	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
	5	9.97	1.95	Pelargonidina 3,5- <i>O</i> -diglucósido	629.48	630.48	630.13	0.35	C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₅
Extracto de garbanzo crudo /Ligado	1	0.55	4.50	Hidroxitirosol 4- <i>O</i> -glucósido	315.31	316.31	316.11	0.20	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	2	0.63	6.75	Gomisina D	529.33	530.33	530.21	0.12	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	3	0.99	55.29	Enterodiol	301.33	302.33	302.15	0.18	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
	4	1.57	12.43	Anhidro-secoisolariciresinol	343.38	344.38	344.16	0.22	C ₂₀ H ₂₄ O ₅
	5	9.72	1.67	Floretina 2'- <i>O</i> -glucósido	434.96	435.96	436.13	-0.17	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀
Extracto de garbanzo cocido/ Libre	1	0.55	5.62	Hidroxitirosol 4- <i>O</i> -glucósido	315.31	316.31	316.11	0.20	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	2	0.63	10.33	Gomisina D	529.33	530.33	530.21	0.12	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	3	0.99	59.15	Enterodiol	301.20	302.20	302.15	0.05	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
	4	3.39	5.00	Hesperetina 3',7- <i>O</i> -diglucorónido	653.27	654.27	654.14	0.13	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₈
	5	9.72	4.42	Hidroxitirosol 4- <i>O</i> -glucósido	315.05	316.05	316.12	-0.07	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	6	9.94	2.38	Pelargonidina 3,5- <i>O</i> -diglucósido	629.55	630.55	630.13	0.42	C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₅
Extracto de garbanzo cocido / Conjugado	1	0.55	7.73	6-Geraniilnaringenina	407.40	408.40	408.19	0.21	C ₂₅ H ₂₈ O ₅
	2	0.63	10.09	Gomisina D	529.46	530.46	530.21	0.25	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	3	0.99	67.42	Enterodiol	301.20	302.20	302.15	0.05	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
Extracto de garbanzo cocido / Ligado	1	0.55	3.87	Hidroxitirosol 4- <i>O</i> -glucósido	315.37	316.37	316.11	0.26	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	2	0.66	5.81	Gomisina D	529.39	530.39	530.21	0.18	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀
	3	0.99	55.62	Enterodiol	301.40	302.40	302.15	0.25	C ₁₈ H ₂₂ O ₄
	4	1.56	12.78	Anhidro-secoisolariciresinol	343.38	344.38	344.16	0.22	C ₂₀ H ₂₄ O ₅
	5	9.71	6.61	3,4- ácido diferuloilquinico	543.43	544.43	544.16	0.27	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂

^a Experimental; ^b Teórica; *Identificación basada en la base de datos de compuestos fenólicos en alimentos (Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>)

La capacidad antioxidante no está relacionada proporcionalmente con la cantidad individual de compuestos fenólicos. Un compuesto puede existir en menor proporción que otro y conferir la mayor capacidad antioxidante de la muestra. Una característica que otorga la capacidad antioxidante son los grupos hidroxilos, que al estar unidos a un anillo bencénico, como en el caso de los polifenoles, presentan la posibilidad de que el radical libre interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto a otros alcoholes. Por lo tanto, dependerá de su estructura, donde se ha encontrado que a mayor hidroxilación, mayor capacidad antioxidante (Perez-Perez et al., 2018; Ortega-Moo et al., 2016). Además de los grupos hidroxilos, hay otros factores que hacen que una molécula sea antioxidante, como los dobles enlaces en la estructura, el impedimento estérico y la posición del grupo hidroxilo. Otro factor es la afinidad de los compuestos al radical o a la técnica utilizada.

Por otra parte, la mayoría de los compuestos identificados tras la digestión *in vitro* (Tabla 10) son diferentes de los observados antes del proceso de digestión. Probablemente, las enzimas presentes en cada parte del proceso contribuyeron a las modificaciones estructurales. En la parte de la boca, se observaron compuestos sin glucosas, como el ácido cafeoil tartárico, el *p*-cumaroil tirosina, el siringaldehído y la gliciteína. Esto significa que las enzimas como la beta-glucosidasa y la alfa-amilasa de la saliva pueden liberar estos azúcares de los fenoles (Moser et al., 2018). No fue posible identificar compuestos fenólicos conjugados entre los compuestos liberados en la boca, quizás porque el alimento tiene un tiempo corto en la boca y probablemente la interacción con las enzimas no fue suficiente para reaccionar con estos compuestos. En el estómago, el pH más bajo puede inducir la hidrólisis de los compuestos fenólicos, especialmente los que están unidos a polisacáridos que, en consecuencia, han liberado los compuestos fenólicos, como es el caso de los compuestos fenólicos conjugados (Tabla 10). Sin embargo, en los compuestos fenólicos libres y ligados, se observaron algunos agregados de azúcares, tal vez porque los compuestos fenólicos pueden desestabilizar la estructura de la proteína, reduciendo la accesibilidad de la enzima, disminuyendo la hidrólisis y permitiendo que los azúcares libres se vuelvan a unir a las estructuras fenólicas.

Además los compuestos encontrados en la fracción del intestino delgado (Tabla 10), son compuestos con alta capacidad antioxidante (flavanoles: [(-)-Epicatequina-(2a-7) (4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido]; tirosoles: [tirosol 4-sulfato]; antocianinas: [Pelargonidina 3-O-glucosil-rutinósido y Delfinidina 3-O-(6"-acetil-glucósido)]; isoflavonoides: [Pseudobaptigenina] y ácidos hidroxicinámicos: [Cafeoil glucosa]). En esta parte, la unión de los compuestos fenólicos puede obstaculizar el sitio de unión del sustrato, el sitio catalítico o ambos de la pancreatina, por lo que se reduce su actividad proteolítica y se dejan libres los grupos amino y tiol y los residuos de triptófano, que llegaron a la unión covalente de los compuestos fenólicos (Koeheinlein et al., 2016; Marín et al., 2015). Esta enzima puede disminuir su actividad debido a la posición y grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos, pero con todos esos cambios puede formar diferentes quinonas que son más reactivas. Los compuestos fenólicos que no pudieron atravesar la membrana del intestino delgado pueden deberse a que estos compuestos fenólicos no se liberan de la matriz y pasan directamente al intestino grueso, como ocurre con la mayoría de los compuestos fenólicos ligados. La razón es que están unidos covalentemente a la matriz, principalmente por enlaces éster que son hidrolizados por enzimas de la microbiota como las esterases (Perez-Perez et al., 2018; Velickovic et al., 2018; Giusti et al., 2019).

Tabla 10. Compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados, identificados por UPLC-MS, en el sistema de digestión *in vitro*

Sección gastrointestinal / Muestra	No.	TR (min)	% de área	Compuesto	Masa observada <i>m/z</i>	Masa Exp. ^a (Da)	Masa Teor. ^b (Da)	Delta de masa (Da)	Fórmula molecular
Boca / Libre	1	9.92	7.93	Ácido cafeoil tartárico	311.08	312.08	312.04	0.04	C ₁₃ H ₁₂ O ₉
	2	10.36	1.87	<i>p</i> -Coumaril tirosina	326.23	327.23	327.11	0.12	C ₁₈ H ₁₇ NO ₅
Boca / Conjugado	No identificado								
Boca / Ligado	1	11.45	13.27	Siringaldehído	181.15	182.15	182.06	0.09	C ₉ H ₁₀ O ₄
	2	11.79	9.82	Gliciteína	283.40	284.40	284.07	0.33	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Estómago / Libre	1	8.18	12.36	Kaempferol 3- <i>O</i> -(2"-ramnosil-galactósido) 7- <i>O</i> -ramnósido	738.93	739.93	740.21	-0.28	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
	2	10.00	25.43	Delfinidina 3- <i>O</i> -(6"-acetil-glucósido)	506.52	507.52	507.11	0.41	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃
Estómago / Conjugado	1	1.8	1.84	6-Gerailnaringenina	407.40	408.40	408.19	0.21	C ₂₅ H ₂₈ O ₅
	2	9.91	6.89	1-Cafeoil-5-ácido feruloilquinico	529.46	530.46	530.14	0.32	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂
Estómago /Ligado	1	9.43	5.44	(-)-Epigallocatequina 3- <i>O</i> -glucorónido	481.10	482.10	482.10	0.00	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃
	2	9.99	5.39	Delfinidina 3- <i>O</i> -(6"-acetil-glucósido)	506.52	507.52	507.11	0.41	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃
	3	10.3	9.54	Cianidina 3- <i>O</i> -rutinósido	594.26	595.26	595.16	0.10	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅
	4	10.47	3.76	Quercetina 3- <i>O</i> -glucosil-xilósido	594.65	595.65	596.13	-0.48	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆
Intestino / Libre	1	10.3	3.93	Tirosol 4-sulfato	216.97	217.97	218.02	-0.05	C ₈ H ₁₀ O ₅ S
	2	10.5	2.67	(-)-Epicatequina-(2a-7)(4a-8)-epicatequina 3- <i>O</i> -galactósido	705.13 (18)	706.13	706.19	-0.06	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₅
Intestino / Conjugado	1	8.2	10.90	Pelargonidina 3- <i>O</i> -glucosil-rutinósido	739.91	740.91	741.22	-0.31	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₉
Intestino / Ligado	1	1.85	6.82	Cafeoil glucosa	341.43	342.43	342.09	0.34	C ₁₅ H ₁₈ O ₉
	2	4.06	1.98	Pseudobaptigenina	281.38	282.38	282.05	0.33	C ₁₆ H ₁₀ O ₅
	3	9.98	8.40	Delfinidina 3- <i>O</i> -(6"-acetil-glucósido)	506.39	507.39	507.11	0.28	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃
	4	10.3	6.25	Tirosol 4-sulfato	217.04	218.04	218.02	0.02	C ₈ H ₁₀ O ₅ S

^a Experimental; ^b Teórica; *Identificación basada en la base de datos de compuestos fenólicos en alimentos (Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>)

Interacción de la microbiota intestinal humana y compuestos fenólicos ligados del garbanzo

Se realizó un experimento de interacción entre los compuestos fenólicos ligados del garbanzo con la microbiota intestinal humana presente en las heces, así como la interacción de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo con un consorcio de bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Veillonella*, *Escherichia* y *Bacteroides* aisladas de heces fecales humanas e identificadas a través de pruebas bioquímicas (Tabla 11). Los cuales han sido reportados como géneros presentes en la microbiota intestinal humana (Michel-Aceves et al., 2017).

Tabla 11. Identificación de género de bacterias aisladas de muestra fecal humana

	Agar Sangre		Agar MacConkey	
Tinción Gram	Bacilos Gram -	Cocos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -
DNAsa	-	+	-	-
Bilis y esculina	+	+	-	-
Urea	-	+	-	-
Citrato	-	+	-	-
TSI	A/A, Gas +, H ₂ S: -	A/A, Gas:+, H ₂ S :+	A/A Gas:- H ₂ S :-	A/A Gas:+ H ₂ S :-
KIA	A/A Gas: + H ₂ S:-	A/A Gas: + H ₂ S :-	A/A Gas:- H ₂ S :-	A/A Gas:+ H ₂ S :-
LIA	Gas: - H ₂ S :- Descarboxilasa:+ Desaminasa: -	Gas: - H ₂ S :- Descarboxilasa:+ Desaminasa: +	Gas: - H ₂ S :- Descarboxilasa:+De saminasa: -	Gas: - H ₂ S :- Descarboxilasa:+ Desaminasa: -
SIM	H ₂ S: - Indol: + Movilidad:-	H ₂ S: + Indol: + Movilidad:-	H ₂ S: - Indol: + Movilidad:+	H ₂ S:- Indol: + Movilidad:+
Catalasa	+	+	-	+
Género	<i>Klebsiella</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Bacteroides</i>

La identificación de compuestos fenólicos ligados liberados tras la interacción con la microbiota intestinal humana y con el consorcio de bacterias aisladas de heces humanas se muestran en las tablas 12 y 13, respectivamente. Se puede observar que los compuestos identificados cuando se emplea la microbiota intestinal (Muestra C, Tabla 12) son: Conidendrina, gliciteína 7-*O*-glucurónido, ácido propiónico 3 hidroxí-3(3-hidroxifenil), ácido fenilpropiónico (Tabla 12). Respecto al consorcio de bacterias (Muestra B, Tabla 13) aisladas interaccionando con los compuestos ligados del garbanzo, se identificaron de manera presuntiva los compuestos: Hesperetina 5,7-*O*-diglucurónido y ácido propiónico 3 hidroxí-3(3-hidroxifenil) (Tabla 13), sin embargo, estos compuestos no corresponden a los presentes en mayor abundancia lo que remarca la necesidad de emplear estrategias como la espectrometría de masas en tándem para la identificación de estos compuestos mayoritarios. Se puede observar que a las 6, 24, 48 y 72 h se presenta un compuesto mayoritario aproximadamente a los 9.7 min con porcentajes de área bajo la curva de 63.69, 35.39, 54.8 y 86.27 % respectivamente. Sin embargo, este compuesto no pudo ser identificado.

En cuanto a la determinación de capacidad antioxidante, así como de fenoles totales (Figuras 15 y 16), se observa un aumento considerable en la cantidad de compuestos fenólicos en todos los tiempos analizados con respecto a los compuestos ligados liberados por el sistema digestivo *in vitro* que van a vena porta (0.014 mg EAG/g de muestra) y los tiempos de máxima liberación empleando la microbiota intestinal humana (12 y 24 h) (aprox. 17 mg EAG/ g de muestra, Figura 16) indican un aumento de 1214 veces. Además, que se detectaron 26 compuestos de los cuales 5 fueron identificados (Tablas 12 y 13). Se observa que a las 12 y 24 h no existe diferencia significativa en cuanto a la cantidad máxima de compuestos fenólicos liberados tanto por la microbiota intestinal humana como por el consorcio de bacterias aisladas de heces humanas (Figura 16). Lo mismo sucede en la determinación de la capacidad antioxidante siendo 12 y 24 h los tiempos con valores mayores (Figura 15). Esto puede ser debido a la biotransformación de los compuestos por acción de la microbiota así como del consorcio de bacterias aisladas de las heces humanas, sin embargo esos mecanismos no se encuentran muy claros.

Tabla 12. Identificación de compuestos fenólicos procedentes de la interacción de microbiota intestinal humana con compuestos fenólicos ligados del garbanzo (muestra C)

Muestra	No.	TR (min)	% de área	Compuesto	Masa observada <i>m/z</i>	Masa Exp ^a (Da)	Masa Teor ^b (Da)	Delta de Masa (Da)	Fórmula Molecular *
0	1	1.29	94.08	N.I.	486.50	487.50	-	-	-
	2	8.99	5.92	N.I.	737.83	738.83	-	-	-
6	1	1.28	83.14	Conidendrina	355.41	356.41	356.4	-0.01	C ₂₀ H ₂₀ O ₆
	2	9.13	4.53	N.I.	737.96	738.96	-	-	-
12	1	1.25	57.68	N.I.	486.37	487.37	-	-	-
	2	9.10	21.46	N.I.	737.46	738.46	-	-	-
	3	9.46	10.97	Gliciteína 7- <i>O</i> -glucurónido	459.70	460.70	460.4	0.30	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
	4	9.8	5.22	N.I.	189.15	190.15	-	-	-
24	1	9.12	26.89	Ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil)	180.90	181.90	182.17	-0.27	C ₉ H ₁₀ O ₄
	2	9.76	54.33	N.I.	189.09	190.09	-	-	-
48	1	9.12	40.33	Ácido 3-fenilpropiónico	148.86	149.86	150.17	-0.31	C ₉ H ₁₀ O ₂
	2	9.75	25.03	N.I.	188.96	189.96	-	-	-
72	1	9.08	18.20	Ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil)	181.16	182.16	182.17	-0.01	C ₉ H ₁₀ O ₄
	2	9.71	61.07	N.I.	189.02	190.02	-	-	-

^aExperimental; ^bTeórica; *Identificación basada en la base de datos de compuestos fenólicos en alimentos (Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>) N.I. no identificado.

Tabla 13. Identificación de compuestos fenólicos procedentes de la interacción del consorcio de bacterias aisladas de heces humanas con compuestos fenólicos ligados del garbanzo (muestra B)

Muestra	No.	TR (min)	% de área	Compuesto	Masa observada <i>m/z</i>	Masa Exp ^a (Da)	Masa Teo ^b (Da)	Delta de Masa (Da)	Fórmula molecular
0	1	9.15	75.88	N.I.	737.89	738.89	-	-	-
6	1	9.10	28.12	N.I.	738.02	739.02	-	-	-
	2	9.74	63.69	N.I.	189.02	190.02	-	-	-
12	1	2.85	27.10	Hesperetina 5,7- <i>O</i> - diglucuróni do	653.73	654.73	654.5	0.23	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₈
	2	9.12	39.86	N.I.	737.89	738.89	-	-	-
	3	9.76	33.65	N.I.	188.96	189.96	-	-	-
24	1	1.24	28.33	N.I.	486.56	487.56	-	-	-
	2	9.09	11.35	Ácido propiónico 3-hidroxi-3- (3- hidroxifenil)	181.16	182.16	182.1 7	-0.01	C ₉ H ₁₀ O ₄
	3	9.73	35.39	N.I.	188.89	189.89	-	-	-
48	1	9.1	26.99	Ácido propiónico 3-hidroxi-3- (3- hidroxifenil)	181.16	182.16	182.1 7	-0.01	C ₉ H ₁₀ O ₄
	2	9.74	54.8	N.I.	188.89	189.89	-	-	-
72	1	9.74	86.27	N.I.	188.83	189.83	-	-	-

^aExperimental; ^bTeórica; *Identificación basada en la base de datos de compuestos fenólicos en alimentos (Phenol-Explorer 3.6 <http://phenol-explorer.eu/>) N.I. no identificado.

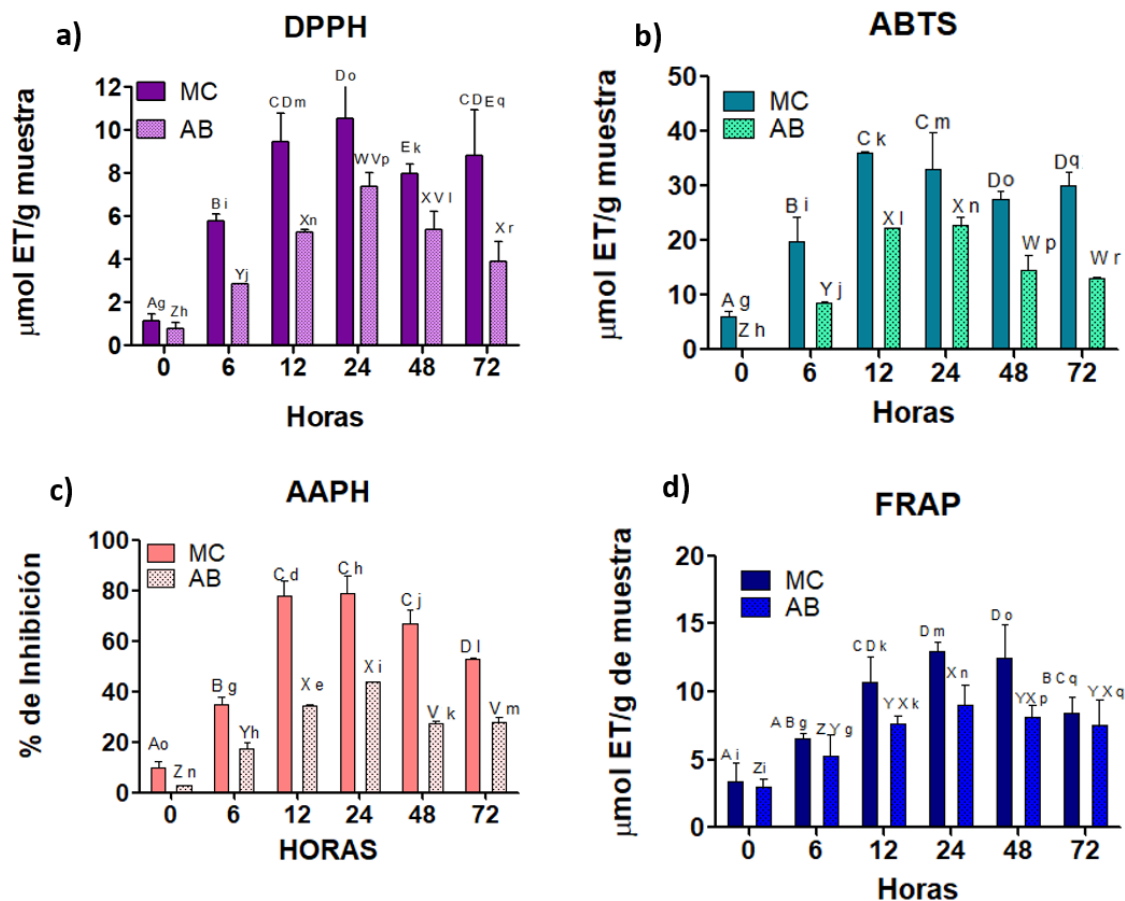


Figura 15. Determinación de capacidad antioxidante con los radicales y los métodos: a) DPPH, b) ABTS, c) AAPH, d) FRAP, en la interacción de microbiota intestinal (MC) con el garbanzo y la interacción de aislado de bacterias (AB) con el garbanzo.

Letras minúsculas diferentes entre horas indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes entre el mismo tratamiento indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

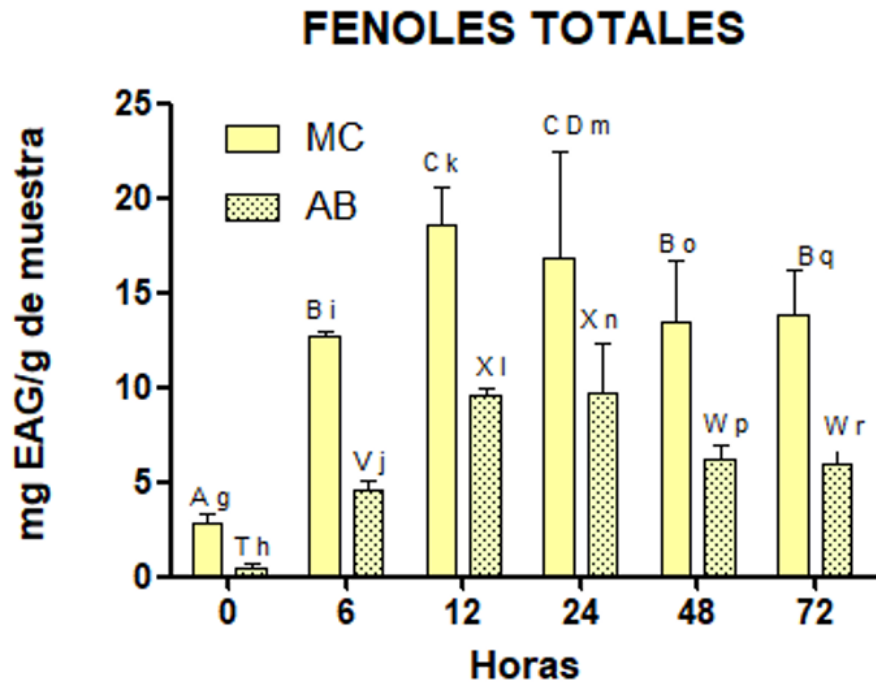


Figura 16. Cuantificación de Fenoles Totales de la interacción de: microbiota intestinal (MC) y aislado de bacterias (AB) con el garbanzo.

Letras minúsculas diferentes entre horas indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes entre el mismo tratamiento indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Dentro de los compuestos identificados en este estudio, la conidendrina es de tipo lignano, la cual han sido identificada en diferentes tipos de granos como el ajonjolí, amapola, girasol, calabaza y linaza y se ha reportado con actividad antioxidante (Ghisoni et al., 2017). Algunas isoflavonas como la gliciteína 7-*O*-glucurónido se encuentran en las leguminosas y pueden ser liberados a través de enzimas como las beta-glucuronidasas derivadas de bacterias de la microbiota humana intestinal (Larkin et al., 2008). Además compuestos como los ácidos fenólicos (ácido 3-fenilpropiónico, ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil)) encontrados en alimentos ricos en carbohidratos, son el resultado de diversas biotransformaciones de compuestos fenólicos complejos y estos gracias a enzimas procedentes de la microbiota humana intestinal (Loo et al., 2020). En el trabajo de Nordlund et al. (2012) identificaron ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil) y ácido 3-fenilpropiónico los cuales fueron encontrados después de la interacción con la microbiota humana intestinal. De igual manera Snelders et al. (2014) reportó la liberación los mismos compuestos a las 6 y 24 h después de la interacción con microbiota humana intestinal gracias a enzimas esterases.

Se ha reportado que la biotransformación de compuestos de tipo flavonol como quercetina, kampferol, luteolina, ácidos hidroxibenzoicos o ácidos gálicos, resultan en derivados como ácido fenilpropiónico, debido a la interacción de la microbiota humana intestinal, principalmente en pastas de trigo (Rocchetti et al., 2017). Además Pasinetti et al. (2018) reportó que el ácido hidroxicinámico y el ácido ferúlico encontrados en alimentos pueden biotransformarse mediante esterases procedentes de *Lactobacillus*. En el estudio de Ou et al. (2014), el compuesto ácido 3-fenilpropiónico constituyó el 50% del total de los metabolitos derivados de procianidinas degradadas por la microbiota intestinal humana, seguido de ácido propiónico 3-(3-hidroxifenil).

En cuanto a los flavonoides como la Hesperetina 5-7-*O*-diclorónido se ha reportado que es metabolizada por la microbiota humana intestinal, presentándose principalmente a las 12 h después de la interacción con bacterias de muestras fecales humanas y con bacterias aisladas de los géneros: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Stevens et al., 2019). Este tipo de compuestos han sido encontrados en cítricos, liberados por enzimas como pectinasas y/o celulasas, por microorganismos de los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Aspergillus* (Zeinab et al., 2020).

Por lo tanto se tiene evidencia que estos compuestos pueden presentarse después de la interacción de alimentos con la microbiota intestinal humana o con algunos tipos de géneros aislados de bacterias, gracias a la probable presencia de enzimas para la liberación de estos compuestos fenólicos.

Identificación de proteínas mediante análisis proteómico tipo shotgun

Antes de proceder a enviar las muestras A (bacterias aisladas), B (bacterias aisladas + garbanzo) y C (microbiota humana + garbanzo) al análisis de LC-MS/MS, se procedió a realizar un gel SDS-PAGE al 13.5% en donde se aprecia el perfil de las proteínas presentes en las muestras (Figura 17). Posteriormente se analizaron mediante LC-MS/MS.

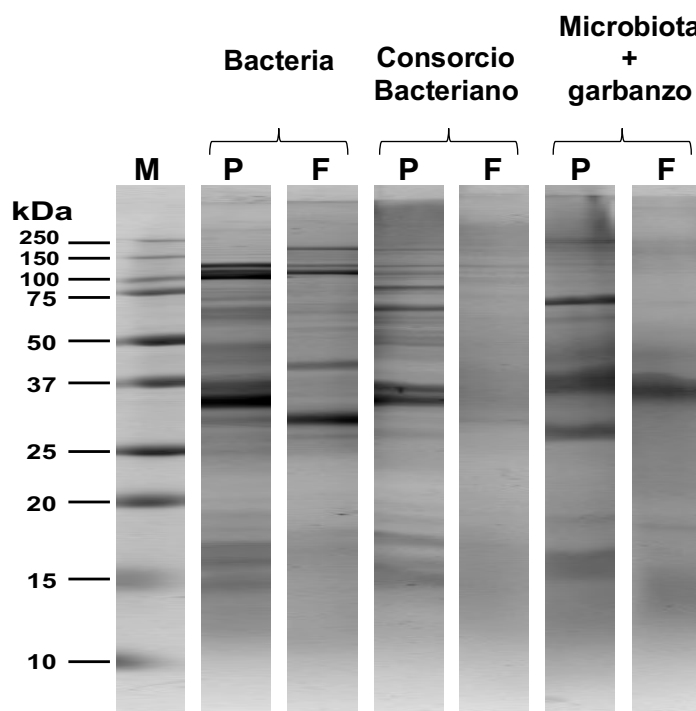


Figura 17. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Carril M:marcador molecular, Carril P: Pellet, Carril F: Filtrado sobrenadante > 10kDa.

Se identificaron 634 proteínas procedentes de bacterias y 23 proteínas procedentes del garbanzo (Anexo 5). En las tablas 14, 15 y 16 se muestran las enzimas identificadas que por su actividad

podieran estar relacionadas con la liberación de los compuestos ligados del garbanzo, entre ellas se encontraron glucosidasas (Aconitato hidratasa, Alquil hidroperóxido reductasa y Beta-glucosidase BglX) y esterases (Acil CoA esterasa, enterobactina esterasa férrica, proteína de la familia de las esterases, esterasa FrsA y pectin esterasa). Dentro de las glucosidasas identificadas de la muestra de bacterias aisladas, éstas cumplen con las siguientes funciones:

Aconitato hidratasa, participa en la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs. Alquil hidroperóxido reductasa subunidad F y Alquil hidroperóxido reductasa, son peroxidases específicas de tiol que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroxilos orgánicos al agua y alcoholes respectivamente. Desempeñan un papel en la protección celular contra el estrés oxidativo mediante peróxidos desintoxicantes. Beta-glucosidase es una enzima que realiza la hidrólisis de residuos no reductores beta-D-glucosa con la liberación de ésta (UniProt 2020).

En cuanto a las esterases: Acil CoA esterasa, se refiere a la liberación de la coenzima A. La acil coenzima A son grupos acilos derivados de ácidos carboxílicos unidos a la coenzima A mediante enlaces tioéster (Liu 2004). La enterobactina esterasa férrica, enterobactina esterase y enteroquelina esterasa, son enzimas que liberan el hierro del complejo de ferrienterobactina. Las enterobactinas son también llamadas enteroquelinas y son compuestos sideróforos, los cuales se encuentran presentes en bacterias regularmente Gram negativas anaerobias o facultativas (Khan et al., 2018). La proteína de la familia de las esterases, realiza la hidrólisis de cualquier enlace de compuestos glucosílicos en los carbohidratos. La enzima esterasa FrsA, cataliza la hidrólisis de ésteres en la proteína de fermentación-respiración (FrsA), también hidroliza compuestos de las bases nitrogenadas ligadas a ribonucleósidos o desoxirribonucleósido (Wang et al., 2019).

Dentro de la funcionalidad de las pectin esterases son enzimas que hidrolizan los enlaces esterés generalmente entre el metanol y el ácido galacturónico. Estas enzimas se encuentran en microorganismos capaces de realizar la degradación de la pared celular (principalmente la pectina) de diversas plantas (Lissau et al., 1997).

La pectina es un grupo complejo de heteropolisacárido con diferentes grados de esterificación, el cual puede tener de 200 a 1000 unidades de ácido galacturónico, ligado por enlaces 1-4 alfa glucosídicos, las cuales están presentes en la pared celular de las plantas. Estos compuestos se encuentran generalmente asociados con otros componentes como celulosa, hemicelulosa y lignina entre otros.

La pectina puede ser dividida en 2 clases, ácidos pectínicos, los cuales tienen una pequeña proporción de ácidos galacturónicos como los metil ésteres y ácidos pécticos, los cuales contienen solo esterificación libre de ácido galacturónico. Este tipo de estructuras confiere algunos grados de interacción con otros componentes en el alimento como los compuestos fenólicos. Este tipo de esterificaciones tiene la característica de atrapar compuestos fenólicos, impidiendo que realicen sus actividades antioxidantes (Mercado-Mercado et al., 2020). Por lo tanto, la pectin esterasa puede ser la enzima que esté influyendo en su mayoría en la liberación de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo.

Tabla 14. Enzimas identificadas en la muestra A (bacterias aisladas) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos

Número de acceso*	Identificador	Número de péptidos identificados	Peso molecular (kDa)	Pellet	Filtrado
S5MTH4	Pectin esterase OS= <i>Salmonella bongori</i> N268-08	2	45.844	2	-
A0A1E5X0U4	Acyl-CoA esterase OS= <i>Escherichia coli</i>	2	28.477	-	2
A0A5D1WN92	Enterochelin esterase OS= <i>Klebsiella grimontii</i>	2	60.619	1	-
A0A377Z9K1	Enterobactin esterase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	37.939	1	-
A0A377UXZ5	Esterase FrsA OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	68.343	2	1
F1CYM4	Aconitate hydratase (Fragment) OS=bacterium enrichment culture clone P56-2C	2	35.064	-	2
Q3ZV03	Strongly similar to ferrienterobactin receptor OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	2	89,268	1	1
Q7CR42	Putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)	3	22.317	2	3
Q3ZUZ5	Alkyl hydroperoxide reductase C OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	5	20.764	2	4

*Base de datos UniProt

Tabla 15. Enzimas identificadas en la muestra B (bacterias aisladas + garbanzo) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos

Número de acceso*	Identificador	Número de péptidos identificados	Peso molecular (kDa)	Pellet	Filtrado
S5MTH4	Pectin esterase OS= <i>Salmonella bongori</i> N268-08	2	45.844	2	-
A0A2X2E5X6	Ferric enterobactin esterase OS= <i>Raoultella planticola</i>	2	44.906	2	-
A0A376PWZ1	Predicted esterase OS= <i>Escherichia coli</i>	2	21.702	2	-
A0A377Z9K1	Enterobactin esterase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	37.939	-	1
A0A377UXZ5	Esterase FrsA OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	68.343	7	2
F1CYM4	Aconitate hydratase (Fragment) OS=Bacterium enrichment culture clone P56-2C	2	35.064	2	-
Q3ZV03	Strongly similar to ferrienterobactin receptor OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	2	89,268	1	2
A0A5B1X6P7	Beta-glucosidase BglX OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	83.414	3	-
Q3ZUZ4	Strongly similar to alkyl hydroperoxide reductase subunit F OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	3	55.921	3	-
Q7CR42	Putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)	3	22.317	3	2
Q3ZUZ5	Alkyl hydroperoxide reductase C OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	5	20.764	5	3

*Base de datos UniProt

Tabla 16. Enzimas identificadas en la muestra C (microbiota intestinal humana + garbanzo) que pueden estar relacionadas con la liberación de compuestos fenólicos

Número de acceso*	Identificador	Número de péptidos identificados	Peso molecular (kDa)	Pellet	Filtrado
A0A5D1WN92	Enteroquelina esterasa OS= <i>Klebsiella grimontii</i>	2	60.619	1	1
A0A377Z9K1	Enterobactina esterase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	37.939	1	-
A0A3U0NRT4	Esterase family protein OS= <i>Escherichia coli</i>	2	42.699	1	1
A0A377UXZ5	Esterase FrsA OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	68.343	6	-
Q3ZUZ4	Strongly similar to alkyl hydroperoxide reductase subunit F OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	3	55.921	2	-
Q7CR42	Putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)	3	22.317	3	0
Q3ZUZ5	Alkyl hydroperoxide reductase C OS= <i>Cronobacter sakazakii</i>	5	20.764	3	0

*Base de datos UniProt

CONCLUSIONES

- Se logró determinar y cuantificar los compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados en garbanzo crudo y cocido, siendo los compuestos fenólicos ligados los mayoritarios (Aprox. 79%).
- En cuanto al uso de las atmósferas modificadas, los compuestos fenólicos (libres, conjugados y ligados) como la capacidad antioxidante son constantes en el garbanzo cocido hasta 50 días de almacenamiento a bajas temperaturas (4 y -20 °C) bajo atmósfera con N₂, por lo que esta tecnología podría utilizarse en un futuro para conservar más a este tipo de productos en cuanto a sus propiedades bioactivas.
- Dentro de los compuestos fenólicos mayoritarios identificados por UPLC-MS fueron enterodiol, delphinidina -3-O-(6"-acetil-glucósido), (-)-epigallocatequina 3-O-glucorónido, quercetina -3-O-glucosilxilósido, ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenol), compuestos de importancia, por sus propiedades antioxidantes.
- Dentro de la digestibilidad, los fenólicos libres y conjugados presentaron mayor bioaccesibilidad en el modelo gastrointestinal *In vitro*. La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos ligados en el garbanzo es casi nula durante la exposición a las enzimas digestivas en el proceso de digestión *In vitro*. Sin embargo, la microbiota intestinal humana libera los compuestos fenólicos ligados del garbanzo en mayor cantidad a las 12 y 24 h de fermentación.
- Se logró la identificación de bacterias de la microbiota intestinal humana a nivel de género a partir de pruebas bioquímicas, donde se obtuvieron los anaerobios facultativos *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacteroides* y *Veionella* que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. A partir de estos aislados bacterianos, se lograron identificar varias enzimas esterases, entre ellas la enzima pectin-esterasa que se encuentra relacionada con la liberación de compuestos fenólicos atrapados en la pared celular del garbanzo. Con los presentes resultados, podríamos utilizar este tipo de enzimas para liberar los compuestos fenólicos de otras matrices alimentarias antes de poder ingerirlos y hacerlos así más bioaccesibles y biodisponibles al consumirlos.

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO: “Identificación del perfil enzimático utilizado por la microbiota humana intestinal para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.)”

Se le invita a participar en este estudio de investigación, realizado por la Universidad de Sonora en el Departamento de Investigación de Posgrado de Alimentos (DIPA) ubicado en el edificio 5H planta alta en el Laboratorio de Biotecnología. El objetivo del estudio es la obtención de heces fecales como medio de estudio para el aislamiento de diversos géneros de microorganismos para posteriormente realizar fermentaciones para conocer el efecto de la microbiota humana intestinal sobre la liberación y transformación de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo.

Si usted desea participar de manera voluntaria necesita contar con los siguientes requisitos:

1. Contar con la edad de 25-50 años
2. Tener un peso entre 50-80 kg
3. No haber tomado antibiótico al menos 6 meses antes de la toma de muestras
4. No hayan consumido alimentos ricos en polifenoles al menos 48 horas antes (frutas y legumbres)
5. No haber consumido laxantes en los últimos 6 meses
6. No haber consumido probióticos en los últimos 6 meses

La investigación consiste en donar una sola vez una muestra de heces fecales, sin que ésta se encuentre en contacto con la taza de baño ni con la orina, de la siguiente manera:

a) Cuando el voluntario se encuentre listo para donar la muestra, tendrá que estar físicamente en el Laboratorio de Biotecnología para que en cuanto pueda donar dicha muestra se dirija al sanitario controlado que se le asignará para la donación, ya que la muestra no debe exponerse más de 20 minutos después de la evacuación.

b) En el sanitario, levante la tapa del inodoro y coloque papel plástico (le será proporcionado) sobre la taza del inodoro, que esté asegurado con cinta adhesiva para evitar que la muestra caiga en la taza del inodoro.

c) Haga una depresión en la envoltura de plástico para facilitar la recolección de la muestra. Baje la tapa del inodoro y proceda a la expulsión de heces fecales.

d) No expulse dentro del inodoro. No debe orinar en la muestra.

e) Abra el envase e incorpore la muestra de heces fecales en el frasco estéril con ayuda del batelenguas que se le proporcionará.

f) Al terminar tape el frasco con la tapa inmediatamente y entregue la muestra al investigador.

Toda la información que se proporcione para el estudio será estrictamente confidencial, únicamente utilizada para fines científicos y no se encontrará disponible para ningún otro propósito. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y no tendrá ningún costo. Para cualquier duda podrá solicitar información al investigador responsable:

Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez

6622592207 Ext. 4891

Horario: 9:00 am-3:00 pm

Celular: 6624709179

Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Desde este momento le agradecemos su participación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaro que se me ha explicado claramente los objetivos del estudio “Identificación del perfil enzimático utilizado por la microbiota humana intestinal para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.)”. Acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por la Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es: la obtención de las heces fecales como medio de estudio para el aislamiento de diversos géneros de microorganismos para posteriormente realizar fermentaciones para conocer el efecto de la microbiota humana intestinal sobre la liberación y transformación de los compuestos fenólicos ligados del garbanzo.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona. De tener preguntas sobre mi participación en este estudio le informaré a la Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez al teléfono 6624709179.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido.

Nombre _____ **Fecha:** _____

Edad: _____

Peso: _____

Firma del voluntario

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

ANEXO 2

Dictamen de aprobación del Comité de Ética



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora

Hermosillo, Sonora. 12 de marzo de 2019.

Oficio No. CEI-UNISON 09/2019

Dra. Carmen Lizette del Toro Sánchez

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Presente

ASUNTO: Dictamen CEI-UNISON

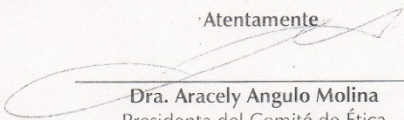
Por este medio, nos permitimos informarle que el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora (CEI-UNISON) ha concluido la revisión del proyecto de investigación "**Identificación del perfil enzimático utilizado por la microbiota humana intestinal para la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (Cicer arietinum L.) cocido expuesto a diferentes atmósferas modificadas**", recibido el día 18 de septiembre de 2018, que usted envió solicitando la valoración ética correspondiente. En respuesta a su solicitud, el CEI-UNISON emite el siguiente:

DICTAMEN APROBADO

El CEI-UNISON considera que en la investigación propuesta hay riesgos mínimos para los participantes y que puede ejecutarse en los tiempos programados. Le solicitamos que informe al CEI-UNISON, en un plazo que no supere los 12 meses desde el comienzo del estudio, un resumen de los avances del proyecto, particularmente de los aspectos éticos correspondientes. Le solicitamos que cualquier adición al proyecto que involucre aspectos éticos sea informado a este Comité antes de proceder a su eventual implementación. Finalmente, le comunicamos que los datos de este proyecto no podrán ser utilizados para otro proyecto, a menos que el segundo proyecto sea evaluado y aprobado por la Comisión.

Sin otro particular, aprovecho el medio para hacerle llegar un cordial saludo.

Atentamente



Dra. Aracely Angulo Molina
Presidenta del Comité de Ética
en Investigación de la Universidad de Sonora

C.c.p. Archivo CEI-UNISON.

ANEXO 3

Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson de compuestos fenólicos contra extractos de garbanzo crudo, cocido y digestibilidad con diferentes técnicas antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, AAPH)

		Libres			Conjugados			Ligados		
		r	R ²	Ecuación de regresión	r	R ²	Ecuación de regresión	r	R ²	Ecuación de regresión
Extracto Crudo	ABTS	0.911	0.831	y = 0.2487x + 1.3084	0.952	0.908	y = 3.0772x - 64.108	0.887*	0.787	y = 0.2975x - 1.105
	DPPH	0.867	0.752	y = 0.2137x + 4.5855	0.982	0.965	y = 0.5194x + 3.183	0.885*	0.784	y = 0.536x - 43.363
	FRAP	0.449*	0.202	y = 0.021x + 17.587	0.814*	0.663	y = 0.1063x + 63.468	0.926*	0.858	y = 0.0273x + 67.30
	AAPH	0.911*	0.830	y = 0.1538x + 2.6971	0.879*	0.773	y = 1.7113x + 22.097	0.950*	0.902	y = 0.2286x + 43.08
Extracto Cocido	ABTS	0.909	0.826	y = 0.1093x + 6.1471	0.852	0.877	y = 0.1776x + 5.6806	0.938*	0.880	y = 0.0712x + 13.89
	DPPH	0.708	0.502	y = 0.26x + 1.8703	0.950	0.903	y = 1.2526x - 14.664	0.945*	0.893	y = 0.1263x + 13.37
	FRAP	0.975*	0.464	y = 0.878x + 2.7693	0.928*	0.903	y = 1.2526x - 14.664	0.966*	0.933	y = 0.0264x + 27.64
	AAPH	0.941*	0.885	y = 0.6273x - 7.5899	0.873*	0.762	y = 1.477x + 3.076	0.927*	0.792	y = 0.0617x + 36.06
Boca	ABTS	0.944	0.892	y = 12.12x - 35.793	0.775	0.601	y = 1.4174x - 0.6383	0.900*	0.810	y = 2.1852x - 8.212
	DPPH	0.919*	0.845	y = 1.7254x - 4.7489	0.818	0.670	y = 0.4523x - 0.7133	0.867	0.753	y = 0.5522x - 3.611
	FRAP	0.919	0.845	y = 2.1626x - 2.1502	0.934	0.873	y = 1.4424x + 0.6486	-0.40*	0.164	y = -0.5839x + 6.07
	AAPH	0.906*	0.821	y = 8.2039x - 24.577	0.979*	0.959	y = 5.7014x - 7.1902	0.033*	0.001	y = 0.0904x + 2.210
Estómago	ABTS	0.969	0.940	y = 4.0086x - 18.941	0.910	0.829	y = 13.866x - 69.655	0.838	0.702	y = 4.7873x - 58.49
	DPPH	0.861	0.742	y = 5.612x - 27.813	0.971	0.943	y = 1.0803x - 3.4199	0.957*	0.917	y = 5.6158x - 68.31
	FRAP	0.953*	0.908	y = 2.4281x - 9.9923	0.857*	0.735	y = 1.2039x + 5.2369	0.816*	0.666	y = 3.808x - 46.088
	AAPH	0.914*	0.836	y = 4.9206x - 25.37	0.876*	0.768	y = 9.6643x - 42.663	0.934*	0.873	y = 4.2186x - 51.24
Intestino delgado	ABTS	0.973	0.946	y = 3.1312x - 16.15	0.987	0.975	y = 0.6206x + 2.8762	0.984*	0.969	y = 0.197x + 3.4068
	DPPH	0.845	0.715	y = 2.3717x - 13.542	0.633	0.401	y = 0.5047x + 1.9705	0.931*	0.868	y = 0.9225x - 20.39
	FRAP	0.733*	0.538	y = 1.2687x - 3.4287	0.818*	0.670	y = 0.2083x + 29.996	0.879*	0.774	y = 0.3224x + 0.932
	AAPH	0.897	0.806	y = 6.2323x - 42.886	0.689*	0.475	y = 0.8905x + 23.144	0.949	0.900	y = 1.4199x - 46.10
Vena Porta	ABTS	0.968*	0.937	y = 3.1778x - 15.629	0.876	0.768	y = 1.7017x - 9.4841	0.943	0.890	y = 0.1582x + 2.442
	DPPH	0.941*	0.887	y = 3.377x - 20.915	0.642*	0.413	y = 0.5626x + 0.256	0.980*	0.961	y = 1.7186x - 5.784
	FRAP	0.900*	0.811	y = 1.5875x - 6.1868	0.826*	0.682	y = 0.3573x + 25.368	0.807*	0.651	y = 0.2477x + 3.538
	AAPH	0.968*	0.938	y = 10.003x - 66.887	0.145*	0.021	y = 0.2056x + 16.538	0.971*	0.942	y = 2.8361x - 5.250

Tabla 18. Coeficientes de correlación de Pearson de compuestos fenólicos contra muestras C y B con diferentes técnicas antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, AAPH)

	ABTS				DPPH				FRAP				AAPH			
	h	r	R ²	Ecuación de regresión	r	R ²	Ecuación de regresión	r	R ²	Ecuación de regresión	r	R ²	Ecuación de regresión			
Muestra C	0	0.910	0.829	y=1.1417x + 2.8258	0.975	0.951	y=0.2077x + 0.5377	0.854	0.730	y=1.7808x - 1.6373	0.921	0.848	y=1.8005x + 3.7974			
	6	0.859	0.738	y=2.7269x - 14.838	0.861	0.742	y=0.1294x - 0.5211	0.886	0.786	y=0.1373x + 4.0053	0.738	0.545	y=2.6286x + 0.5284			
	12	0.983	0.967	y=0.8383x + 20.439	0.705	0.498	y=0.5883x - 1.4764	0.926	0.858	y=0.5721x + 0.0751	0.902	0.814	y=1.643x + 47.358			
	24	0.799	0.638	y=1.712x + 4.142	0.877	0.770	y=0.2338x + 6.5009	0.813	0.661	y=0.2987x + 7.9452	0.822	0.675	y= 0.811x + 64.467			
	48	0.925	0.856	y=1.1059x + 11.828	0.927	0.860	y=0.8582x - 3.5634	0.975	0.952	y=1.0425x - 1.6613	0.994	0.988	y = 3.746x + 16.049			
	72	0.798	0.638	y=1.5578x + 8.5771	0.914	0.836	y = .6631x - 0.3494	0.926	0.858	y = .3013x + 4.2162	0.823	0.678	y=0.1613x + 49.961			
Muestra B	0	-0.788	0.622	y=-0.0021x + 0.3281	0.678	0.460	y=1.0989x + 0.2155	0.747	0.559	y=1.5605x + 2.2143	0.743	0.553	y= 3.2204x + 1.3026			
	6	-0.597	0.356	y= -0.176x + 9.3643	0.845	0.715	y=0.4911x + 0.5849	0.851	0.725	y=1.3643x - 1.0593	0.854	0.730	y=5.0008x - 5.9647			
	12	0.793	0.630	y=0.1574x + 20.676	0.933	0.871	y=0.8917x - 3.2396	0.986	0.972	y=1.0179x - 2.0628	0.853	0.727	y= 5.2834x - 16.003			
	24	0.436	0.190	y=0.284x+ 20.091	0.937	0.879	y=0.6671x+0.8462	0.664	0.441	y=0.2624x+ 6.393	0.795	0.633	y=0.6057x+37.963			
	48	0.776	0.602	y=2.0995x+ 1.7178	0.976	0.954	y=0.547x+2.0053	0.904	0.817	y=1.0295x+ 1.7985	0.953	0.908	y=5.1977x- 4.9184			
	72	0.765	0.589	y=3.9433x- 10.352	0.654	0.427	y=0.467x+1.135	0.597	0.357	y=3.2556x- 11.786	0.596	0.355	y=2.2361x+14.427			

ANEXO 4

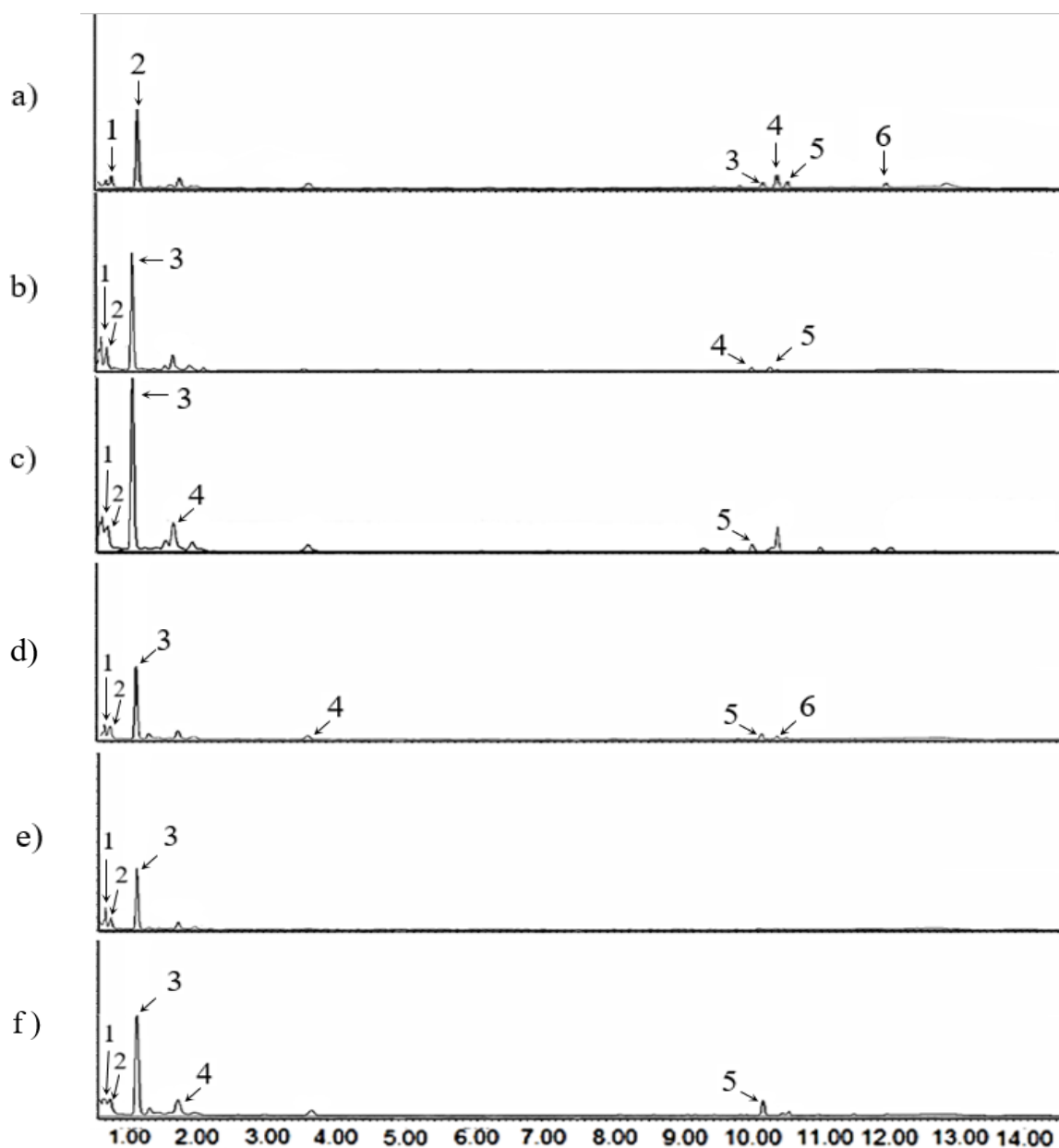


Figura 18. Cromatogramas de extractos de garbanzo crudo y cocido: a) Garbanzo crudo libre, 1=Gomisina D, 2=Enterodiol, 3=Hidroxitirosol 4-*O*-glucósido, 4=Pelargonidina 3,5-*O*-diglucósido, 5=1,4-Naftoquinona, 6=*p*-Coumaroil glucosa; b) Garbanzo crudo conjugado, 1=6-Geranylaringenina, 2= Gomisina D, 3= Enterodiol, 4=Isorhamnetina, 5= Pelargonidina 3,5-*O*-diglucósido; c) Garbanzo crudo ligado 1= Hidroxitirosol 4-*O*-glucósido, 2= Gomisina D, 3= Enterodiol, 4=Anhidrosecoisolariciresinol, 5=Floretin 2'-*O*-glucósido; d) Garbanzo cocido libre, 1= Hidroxitirosol 4-*O*-glucósido, 2= Gomisina D, 3= Enterodiol, 4= Hespertina 3', 7-*O*-diglucorónido, 5= Hidroxitirosol 4-*O*-glucósido, 6= Pelargonidina 3,4-*O*-diglucósido; e) Garbanzo cocido conjugado 1=6-Geranylaringenin, 2=Gomisina D, 3=Enterodiol; f) Garbanzo cocido ligado, 1= Hidroxitirosol 4-*O*-glucósido, 2= Gomisina D, 3= Enterodiol, 4= Anhidrosecoisolariciresinol, 5=3,4-ácido diferuloilquinico.

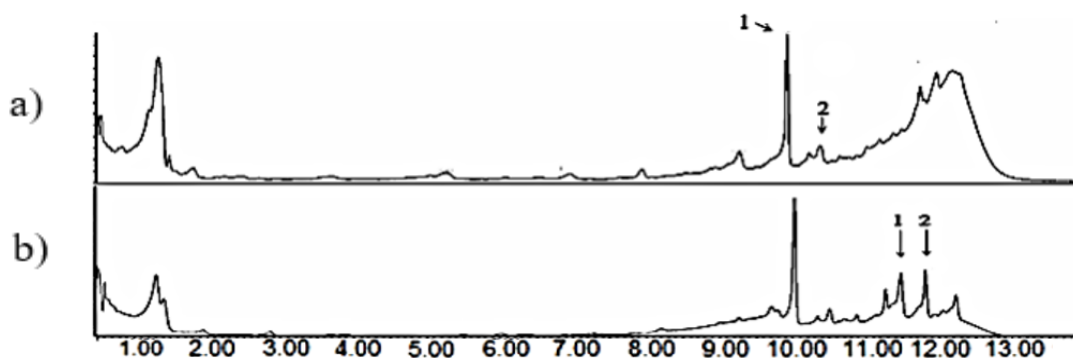


Figura 19. Cromatogramas de extractos digestión *in vitro* boca: a) Boca libre, 1=Ácido cafeoil tartárico, 2=*p*-Coumaroil tirosina; b) Boca ligado, 1=Siringaldehído, 2=Glicina.

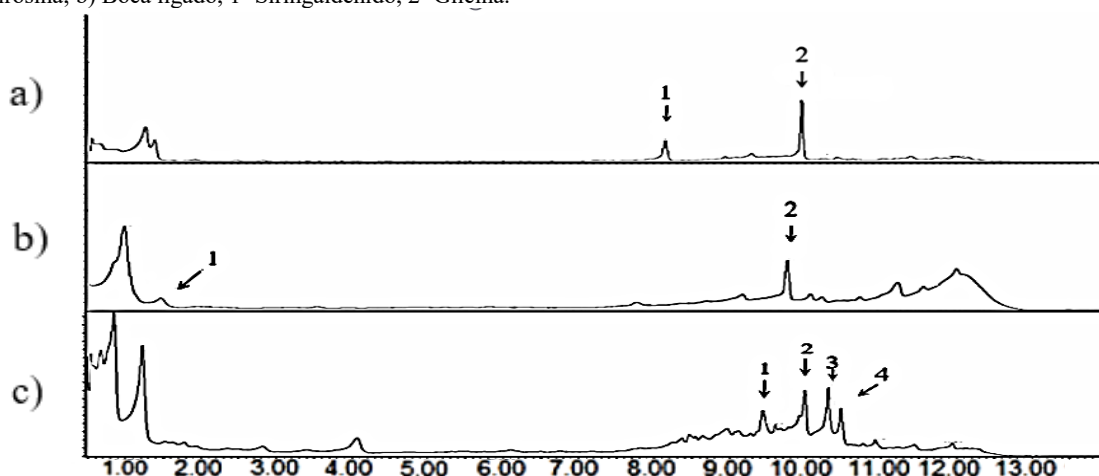


Figura 20. Cromatogramas de extractos digestio *in vitro* estomago : a) Estómago libre 1=Kaempferol 3'-*O*-(2''-ramnosil-galactósido)7-*O*-ramnósido, 2=Delfinidina 3-*O*-(6''-acetil-glucósido); b) Estómago conjugado, 1=6-Geranylningena, 2=1-Cafeoil-5 ácido feruloilquinico; c) Estómago ligado, 1=(-)-Epigalocatequina 3-*O*-glucorónido, 2=Delfinidina 3-*O*-(6''-acetil-glucósido)

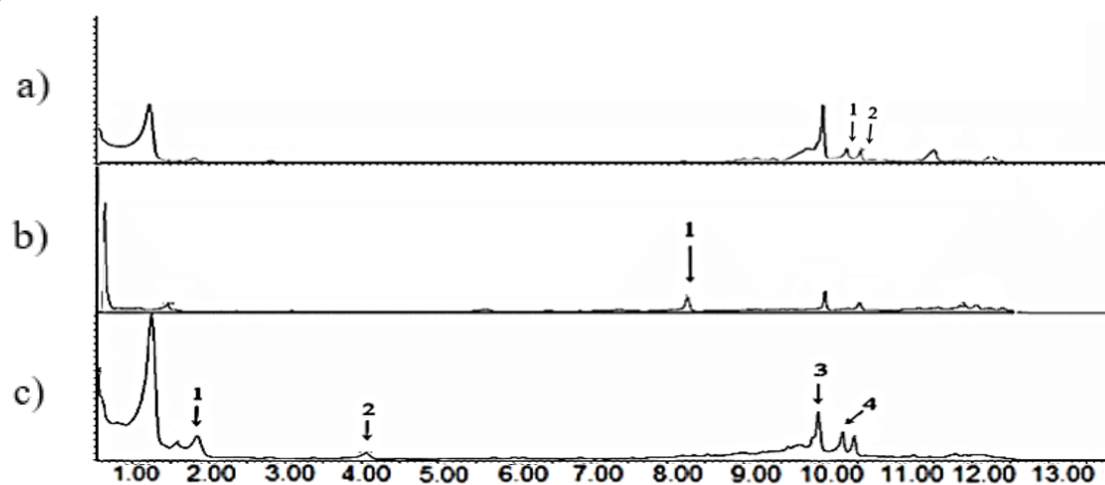


Figura 21. Cromatogramas de extarctos digestión *in vitro* intestino: a) Intestino libre 1=Tirosol 4-sulfato, 2=(-)-Epigacatequina (2a -7)(4a-8)-epicatequina 3-*O*-galactósido; b)Intestino conjugado 1=Pelargonidina 3-*O*- glucosil-rutinósido; c) Intestino Ligado 1=Cafeoil glucosa, 2=Pseudobaptigenina, 3= Delfinidina 3-*O*-(6''-acetil-glucósido), 4=Tirosol 4-sulfato.

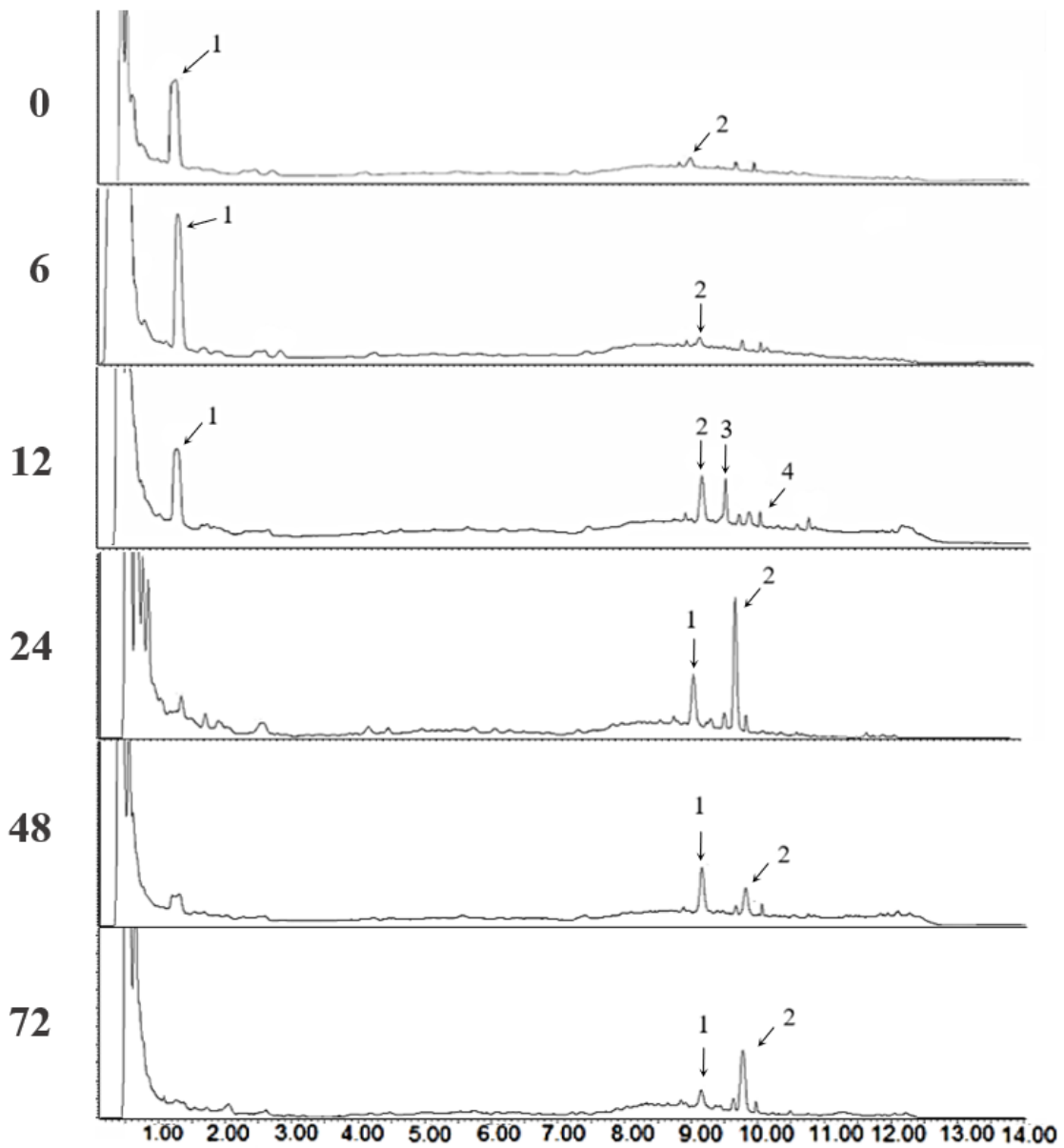


Figura 22. Cromatogramas de muestra C a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de fermentación. 0: 1 y 2 compuestos no identificados; 6: 1 conidrina, 2 no identificado; 12: 1, 2 y 4 no identificado, 3 Gliciteína 7-O-glucurónico; 24: 1 ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil), 2 no identificado; 48: 1 ácido 3-fenilpropiónico, 2 no identificado; 72: 1 ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil) 2 no identificado.

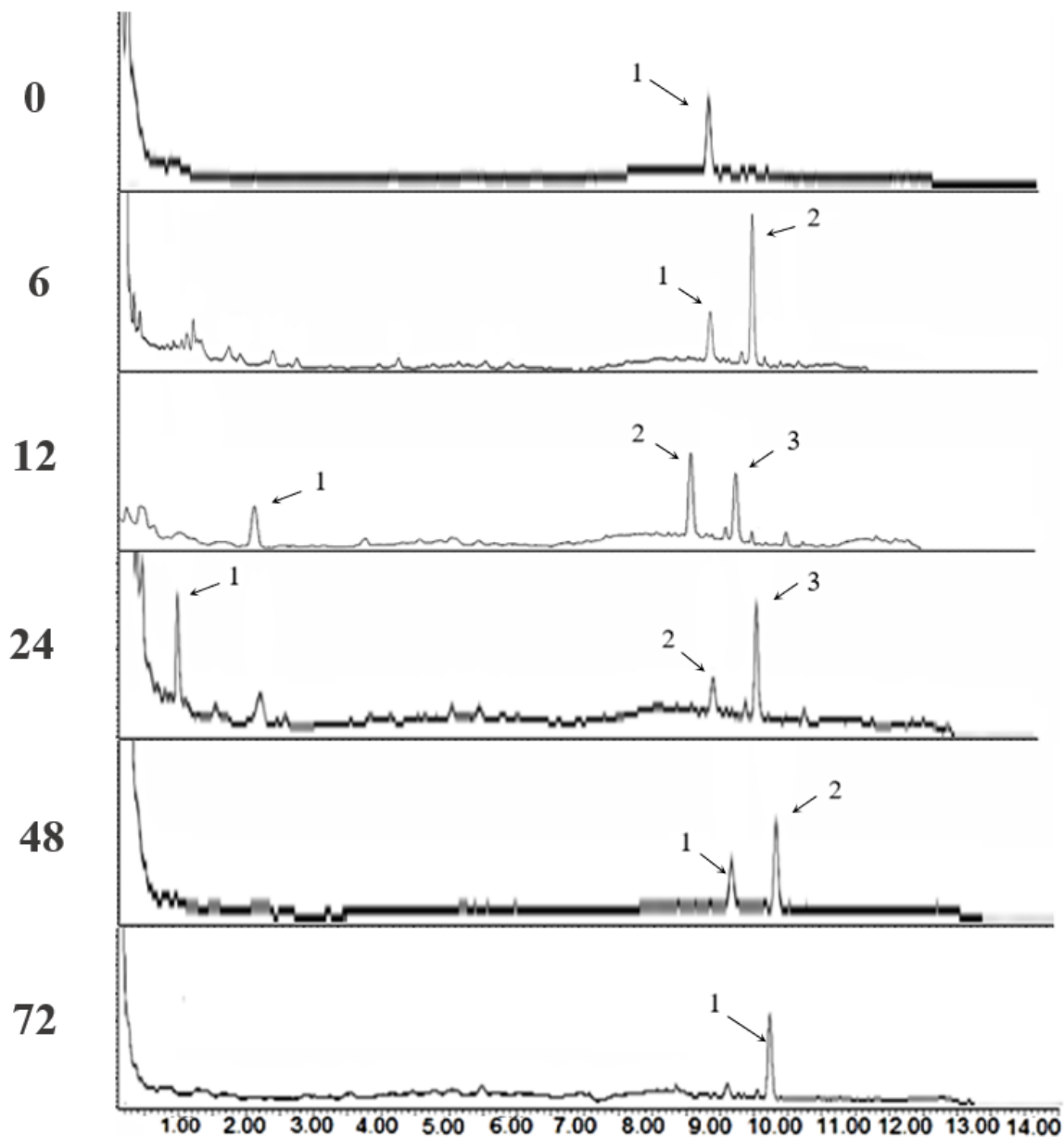


Figura 23. Cromatogramas de muestra B a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. de fermentación. 0: 1 no identificado; 6: 1 y 2 no identificados; 12: 1 Herperetina 5,7-*O*-diglucurónido, 2 y 3 no identificados; 24: 1 y 3 no identificados, 2 ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil); 48: 1 ácido propiónico 3-hidroxi-3-(3-hidroxifenil), 2 no identificado; 72: 1 no identificado.

ANEXO 5

Tabla 19. Identificación de proteínas en filtrado de la muestra A

Número de acceso*	Identificador
Q88LE5	3-isopropylmalate dehydrogenase OS= <i>Pseudomonas putida</i> (strain ATCC 47054 / DSM 6125 / NCIMB 11950 / KT2440)
A4IJP9	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase OS= <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (strain NG80-2)
P40288	Glucose 1-dehydrogenase OS= <i>Bacillus megaterium</i>

*Base de datos UniProt

Tabla 20. Identificación de proteínas en el pellet de la muestra A

Número de acceso*	Identificador
A4XZ71	50S ribosomal protein L15 OS= <i>Pseudomonas mendocina</i> (strain ymp)
A4XZ78	50S ribosomal protein L5 OS= <i>Pseudomonas mendocina</i> (strain ymp)
Q2RFR4	30S ribosomal protein S5 OS= <i>Moorella thermoacetica</i> (strain ATCC 39073 / JCM 9320)
A7Z0N3	Enolase-phosphatase E1 OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
C0Z775	Thiamine-phosphate synthase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
C0ZIH9	30S ribosomal protein S7 OS= <i>Bacillus velezensis</i> (strain DSM 23117 / BGSC 10A6 / FZB42)
Q5WLP3	Thiazole synthase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
Q8X8T3	ATP synthase epsilon chain OS= <i>Brevibacillus brevis</i> (strain 47 / JCM 6285 / NBRC 100599)
P091271	30S ribosomal protein S10 OS= <i>Brevibacillus brevis</i> (strain 47 / JCM 6285 / NBRC 100599)
P0AEQ2	50S ribosomal protein L15 OS= <i>Bacillus clausii</i> (strain KSM-K16)
P18956	Histidinol dehydrogenase OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
A4XZ71	Protein HemX OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
A4XZ78	Propanediol utilization protein PduA OS= <i>Salmonella typhi</i>
Q2RFR4	Protein GlcG OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
A7Z0N3	Glutathione hydrolase proenzyme OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
C0Z775	PEP-dependent dihydroxyacetone kinase, dihydroxyacetone-binding subunit DhaK OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
C0ZIH9	Protein GrpE OS= <i>Pseudomonas mendocina</i> (strain ymp)
Q5WLP3	Chaperone protein DnaK OS= <i>Brevibacillus brevis</i> (strain 47 / JCM 6285 / NBRC 100599)

*Base de datos UniProt

Tabla 21. Identificación de proteínas en el filtrado de la muestra B

Número de acceso*	Identificador
Q8CVG7	Soluble cytochrome b562 OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
P0AD52	Ribosome-associated factor Y OS= <i>Shigella flexneri</i>
P37723	Osmotically-inducible lipoprotein B OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)
P64507	Uncharacterized protein YebY OS= <i>Shigella flexneri</i>
Q83PY7	50S ribosomal protein L29 OS= <i>Shigella flexneri</i>
Q06968	Flagellin OS= <i>Salmonella berta</i>
A6T6Y1	Translation initiation factor IF-1 OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
P77754	Periplasmic chaperone Spy OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P69412	Outer membrane lipoprotein RcsF OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
P02906	Sulfate-binding protein OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)

*Base de datos UniProt

Tabla 22 . Identificación de proteínas en el pellet de la muestra B

Número de acceso*	Identificador
A1ADC9	NADH-quinone oxidoreductase subunit I OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC
A1AHE2	L-lactate dehydrogenase OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC
A1AID4	Phosphoenolpyruvate carboxylase OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC
A1IJ23	Acetylglutamate kinase OS= <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / biotype 1B (strain NCTC 13174 / 8081)
P19910	Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit OS= <i>Serratia marcescens</i>
A4WFL2	Glycogen synthase OS= <i>Enterobacter</i> sp. (strain 638)
P45415	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase (Fragment) OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
A6T4W3	
A6TAW4	D-amino acid dehydrogenase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
A6TB43	Arginine--tRNA ligase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
B5XNL4	Cytoskeleton protein RodZ OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A6TG48	Aspartate--ammonia ligase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
A8ADU4	UPF0304 protein CKO_00501 OS= <i>Citrobacter koseri</i> (strain ATCC BAA-895 / CDC 4225-83 / SGSC4696)
P38104	Starvation-sensing protein RspA OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Q8Z6I3	Translation initiation factor IF-3 OS= <i>Salmonella typhi</i>
Q83J98	33 kDa chaperonin OS= <i>Shigella flexneri</i>
Q5GXV3	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS= <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. oryzae (strain KACC10331 / KXO85)
B5XS09	Orotidine 5-phosphate decarboxylase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
C0ZIG5	50S ribosomal protein L11 OS= <i>Brevibacillus brevis</i> (strain 47 / JCM 6285 / NBRC 100599)
DOZY51	Serine endoprotease DegS OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain 14028s / SGSC 2262)
PODTT0	50S ribosomal subunit assembly factor BipA OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P37426	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit alpha OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)
P00550	PTS system mannitol-specific EIICBA component OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P00582	DNA polymerase I OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P00934	Threonine synthase OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Q83KZ1	Mannose-6-phosphate isomerase OS= <i>Shigella flexneri</i>
P04825	Aminopeptidase N OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P0A2E3	RNA polymerase sigma factor RpoD OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)
P0A440	Formyltetrahydrofolate deformylase OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
P0A9K6	PhoH-like protein OS= <i>Shigella flexneri</i>
0AE13	AMP nucleosidase OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
P0AF25	Ribonucleotide monophosphatase NagD OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
P0AG17	Amidophosphoribosyltransferase OS= <i>Shigella flexneri</i>
P10121	Signal recognition particle receptor FtsY OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P21507	ATP-dependent RNA helicase SrmB OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P31979	NADH-quinone oxidoreductase subunit F OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P33363	Periplasmic beta-glucosidase OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
P37411	DNA gyrase subunit A OS= <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)
P69788	PTS system glucose-specific EIICB component OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
76187	Oxidoreductase YdhF OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Q8XBT6	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
Q48447	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>
A6TEB4	Methionine--tRNA ligase OS= <i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC
A6TGB8	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase OS= <i>Enterobacter</i> sp. (strain 638)
B5XZ14	Chaperone protein DnaJ OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
B5XVT8	Probable transcriptional regulatory protein KPK_1906 OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342) 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
B5XZ79	
Q8X9L0	Bifunctional protein HldE OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
P0AB89	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
P69805	Glucose-1-phosphate adenyltransferase OS= <i>Salmonella paratyphi</i> C (strain RKS4594)
B5XNR7	Large-conductance mechanosensitive channel OS= <i>Salmonella paratyphi</i> A (strain ATCC 9150 / SARB42)
B5XWS2	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
B5XYJ1	Elongation factor 4 OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
B5Y275	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
B5XNL6	RNA chaperone ProQ OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
P14846	tRNA-modifying protein YgfZ OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A1ADC9	Leucine--tRNA ligase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A1AHE2	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A1AID4	Isoleucine--tRNA ligase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A1IJ23	Pyridoxine 5-phosphate synthase OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
P19910	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 2 OS= <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
A4WFL2	Fumarate hydratase class I, aerobic OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7
P45415	Molybdopterin adenyltransferase OS= <i>Shigella flexneri</i>
A6T4W3	Glutamine transport ATP-binding protein GlnQ OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
A6TAW4	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)

*Base de datos UniProt

Tabla 23. Identificación de proteínas en el pellet de la muestra C.

Número de acceso*	Identificador
B5XZU3	Enolase-phosphatase E1 OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
A6TGQ0	Thiamine-phosphate synthase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH 78578)
B5XYE8	Thiazole synthase OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i> (strain 342)
P76015	PEP-dependent dihydroxyacetone kinase, dihydroxyacetone-binding subunit DhaK OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Q48436	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming] OS= <i>Klebsiella pneumoniae</i>

*Base de datos UniProt

No se identificaron proteínas en el filtrado de la muestra C.

Tabla 24. Proteínas de garbanzo identificadas en las muestras B y C

Número de acceso*	Identificador	Filtrado muestra B†	Pellet muestra B†	Filtrado muestra C†	Pellet muestra C†
A0A1S2XVG1	Legumin J-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	3	5	4	12
A0A3Q7XNW1	Legumin-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	6	9	4	17
A0A1S2XSB9	Legumin A-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	4	9	4	18
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				
A0A1S2XFW9	OS= <i>Cicer arietinum</i>	2	2	1	2
A0A1S2XSP2	P24 oleosin-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	2	0	0
	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic				
A0A1S2XW85	OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	1	0	2
	Origin recognition complex subunit 1 OS= <i>Cicer arietinum</i>				
A0A1S2YF94	embryonic protein DC-8-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	1	0	1
A0A1S2YPX2	embryonic protein DC-8-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	2	2	0	0
Q9ZP10	Class I chitinase OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	2	1
A0A1S3EJT7	Elongation factor 1-alpha OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	0	2
	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS= <i>Cicer arietinum</i>				
B5LMK9	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS= <i>Cicer arietinum</i>	1	1	0	2
A0A3Q7K751	Eukaryotic initiation factor 4A OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	0	2
	14-3-3-like protein A-like isoform X1 OS= <i>Cicer arietinum</i>				
A0A1S3DYY1	14-3-3-like protein A-like isoform X1 OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	0	2
Q9SMJ4	Legumin OS= <i>Cicer arietinum</i>	3	6	3	12
	seed biotin-containing protein SBP65 OS= <i>Cicer arietinum</i>				
A0A1S2XET4	seed biotin-containing protein SBP65 OS= <i>Cicer arietinum</i>	2	3	0	0
A0A1S2XT99	Elongation factor Tu OS= <i>Cicer arietinum</i>	2	2	2	3
A0A1S2YKU2	Elongation factor 2-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	0	3
	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like OS= <i>Cicer arietinum</i>				
A0A3Q7XNM5	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	1	1	0	3
Q8GTD9	Polyubiquitin (Fragment) OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	3	2
	Alpha-1,4 glucan phosphorylase OS= <i>Cicer arietinum</i>				
A0A1S2XHJ1	Alpha-1,4 glucan phosphorylase OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	0	0	4
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				
A0A1S2YBD0	OS= <i>Cicer arietinum</i>	2	1	0	3
A0A1S3E8T8	Actin-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	0	1	2	4
A0A1S2XQR4	Vicilin-like OS= <i>Cicer arietinum</i>	5	6	0	6

*Base de datos UniProt, †Número de péptidos identificados.

REFERENCIAS

- Acosta-Estrada B. A., Gutiérrez-Urbe J.A., Serna-Saldívar S.O.(2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152,46-55.
- Aguilar-Raymundo V.G, Vélez-Ruiz J.F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7, 25-34.
- Aguilera-Gutiérrez Y. (2009). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecno-funcionales. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid. España. Tesis Doctoral.
- Andrade, R.D.; Palacio, J.C.; Pacheco; W.A.; Betin, R.A. (2012). Almacenamiento de Trozos de Ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) en Atmósferas Modificadas. *Información Tecnológica*, 23(4), 65-72.
- Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williamson, G. y Garcia-Conesa, M.T.(2001). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 31,304- 314.
- Andrés-Lacueva, C.; Medina-Reyon, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventós, R.M. (2010) Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, 1st ed.; Blackwell Publishing Iowa, USA, 53-88.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 16th ed; The Association of Official Analytical Chemists: Arlington, TX, USA, 1997.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed; The Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- Atlas Agroalimentario 2019. Disponible en : <https://federacion-anech.org/2019/11/14/atlas-agroalimentario-2019/>
- Azani N., Babineau M., Bailey D., Banks H. , Barbosa R.A., Barbosa-Pinto R., Boatwright J.S., Borges L.M., Brown K.G., Bruneau A., Candido E., Cardoso D., Chung K., Clark R.P., Conceição A., Crisp M., Cubas P., Delgado-Salinas A., Dexter K.G., Doyle J.J., G.K. Duminil, Egan A.N., De la Estrella M., Falcão M.J., Filatov D.A., Fortuna-Perez A.P., Fortunato R.H., Gagnon E., Gasson P., Gastaldello-Rando J., Goulart de Azevedo A.M., Gunn B., Harris D., Haston E., Hawkins J.A., Herendeen P.S., Hughes E.C., F. Javadi, Kanu S.A., Kazempour-Osaloo S., Kite G.C., Klitgaard B.B., Kochanovski F.J., Koenen E.J., Kovar L., Lavin M., Le Roux M., Lewis G.P., De Lima H.C., López-Roberts M.C., Mackinder B., Maia V.H., Malécot V., Mansano V.F., Marazzi B., Mattapha S., Miller J.T., Mitsuyuki C., Moura T., Murphy D.J., Nageswara-Rao J.M., Nevado B., Neves D., Ojeda D.I., Pennington R.T., Prado D.E., Prenner G., Paganucci

de Queiroz L., Ramos G., Ranzato Filardi L.F., Ribeiro P.G., Rico-Arce M.L., Sanderson M.J., Santos-Silva J., Wallace M.B., São M., Silva M.J.S., Simon M.F., Sinou M.C., Snak C., De Souza R.E., Sprent. J, Steele K.P., Steier J.E., Steeves R., Stirton C.H., Tagane S., Torke B.M., Toyama H., Trabuco da Cruz D., Vatanparast M., Wieringa J.J., Wink M., Wojciechowski M.F., Yahara T., Yi T., Zimmerman E. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny.(2017).*TAXON*,66 (1),44-77.

Balde B.I. (2014). Aplicación de un modelo de digestión *in vitro* para el estudio de estabilidad de compuestos fenólicos de zumo y extracto de granada.. Universidad de Lleida. España. Tesis de Licenciatura.

Barbosa, C.; Rui-Alves, M.; Roche, S.; Oliveira, M.P.P.(2016) Modified Atmosphere Packaging of precooked vegetables: effect on physicochemical properties and sensory quality. *Food Chemistry*, 194, 391-398.

Bar-Eldadon S., Aboo S., Reifen R. (2017). Leveraging traditional crops for better nutrition and health. *Trends in Food Science & Technology*,64,39-47.

Benzie, I.; Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. (1996) *Analytical Biochemistry*, 239,70-76.

Bernal-Jasso (2020). Efecto de enzimas comerciales sobre la liberación de compuestos fitoquímicos de subproductos agroindustriales y evaluación de sus propiedades funcionales. Tesis de maestría

Cabrera-Soto M.L., Salinas-Moreno Y., Velázquez-Cardelas A., Espinoza-Trujillo E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras de grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia*,43, 827-839.

Castañeda C.B., Ramos L.L.E.,Ibañez V.L.(2008).Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*,8(1),56-72.

Chen H., Hayek S., Rivera-Guzman J., Gillitt N.D., Ibrahim S.A., Jobin C., Sang S. (2012). The microbiota is essential for the generation of black tea theaflavins-derived metabolites. *PLOS ONE*, 7 (12),1-10.

Chen, P.X., Dupuis, J.H., Marcone, M.F., Pauls, K.P., Liu, R., Liu, Q., Tang, Y., Zhang, B. y Tsao, R. (2015). Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(48), 10448-10458.

Cooper-Bribiesca. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1),19-22.

- Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N.(2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446-467.
- Cubero-Agüero. (2019) Diversidad de bacterias fitopatógenas, agentes causales de pudrición blanda en hortalizas de las zonas de Cartago y Alajuela, Costa Rica. Tesis de licenciatura.
- De Santiago E., Pereira-Caro G., Moreno-rojas J.M., Cid C. De Peña P.(2018). Digestibility of polyphenols and antioxidant activity in raw and cooked cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (23), 5832-5844.
- Domínguez-Arispuro, D.M.; Cuevas-Rodríguez, E.O.; Milán-Carrillo, J.; León-López, L.; Gutierrez-Dorado, R.; Reyes-Moreno, C. (2018). Optimal germination condition impacts on the antioxidant activity and phenolic acids profile in pigmented desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 55 (2), 638-647.
- Duthie G.G., Gardener P.T., Janet A.M.(2003). Plants polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 599-603.
- Eldeen I.M.S., Seow E-M., Abdullah R., Sulaiman S.F. (2011). *In vitro* antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthus* sp. *South African Journal of Botany*, 77, 75–79.
- Escalante-Aburto. A., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez P.I., López-Cervantes J., Figueroa-Cárdenas JD., Barrón-Hoyos J.M., Morales-Rosas I., Ponce-García N., Gutiérrez-Dorado R. (2014). Obtaining ready to eat blue corn expanded snacks with anthocyanins using an extrusion process and response surface methodology. *Molecules*. 19, 21066-21084.
- FAO, 2017. Production data. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>.
- FAO, 2018. Production data. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Favela-Gomez M. A., García-Armenta E., Reyes-Moreno C., Tiznado-Garzón J. A., Perales-Sanchez J. X. K., Caro-Corrales J. J., Gutierrez-Dorado E. (2017) modelling of water absorption in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds grown in Mexico's northwest. *Revista mexicana de ingeniería química*. 16 (1), 179-191.
- FDA. Food Drug Administration. Code of Federal Regulations Title 21. Disponible : <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=640&showF>
- Ferreira-Dietrich C., Kern-Bubolz V., Da Silva J., Lambrecht-Dittgen C., Ziegler V., De Oliveira Raphaelli C., De Oliveira M. (2019) Changes in the chemical composition and

- bioactive compounds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) fortified by germination. *Food Science and Technology*, 111, 363-369.
- García de Fernando G., Ganan M., Rodríguez M., Aguirre J. (2011). Envasado de alimentos en atmósferas modificadas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 258, 44-49.
- Gavirangappa, H. y Krishnapura, S. (2014). Bioaccessibility of polyphenols from wheat (*Triticum aestivum*), sorghum (*Sorghum bicolor*), green gram (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by domestic food processing. *Journal of agriculture and food chemistry*, 62(46), 11170- 11179.
- Ghisoni S., Chiodelli G., Rocchetti G., Kane D., Lucini L.(2017).UHPLC-ESI-QTOF-MS screeninh of lignans and other phenolics in dry sedes for human consumption. *Journal of Functional Foods*, 34, 229-236.
- Gil-Izquierdo A., Zafrilla P. and Tomás-Barberán F.A. (2002). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214, 155.
- Giusti F.,Capuano E., Sagratini G., Pellegrini N.(2019). A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 285, 458-467.
- Gómez-Sánchez A.I., Vázquez- Aguilar M. M. (2007). Tecnología de empackado en atmósferas modificadas: principios, desarrollo en investigación y aplicaciones.*TSIA Temas selectos de ingeniería de alimentos*,1,66-79.
- González-Vega, R.I.; Cárdenas-López, J.L; López-Elías, J.A.; Ruiz-Cruz, S; Reyes Díaz, A.; Perez-Perez, L.M.; Cinco-Moroyoqui, F.J.; Robles-Zepeda, R.E.; Borboa-Flores, J.; Del-Toro-Sánchez, C.L. (2021). Optimization of growing conditions for pigments production from microalga *Navicula incerta* using response surface methodology and its antioxidant capacity. *Saudi Journal of Biological Science*, 28, 1401–1416.
- Gutiérrez, D. M., Ortiz, C. A. & Mendoza A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. En Simposio de Metrología 2008. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Metrología.
- Han H.,Baik B.K. (2008). Antioxidant activity and phenolic contenido f lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.) peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. (2008). *International Journal of Food Technology*., 43, 1971-1978.
- He Y., Shim Y.Y., Mustafa R., Meda V., Reaney M..J.T. (2019). Chickpea Cultivar Selection to Produce Aquafaba with Superior Emulsion Properties. *Foods*, 8, 685.

- Heiras-Palazuelo MI; Ochoa L; Gutiérrez DR; López VJA; Mora RS; Milán CJ; Garzón TJ; Reyes MC (2013). Technological properties, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of pigmented chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(1),69-76.
- Hernández-Cruz, K; Ruiz-Cruz, S; Cira-Chávez, L.; Gassos-Ortega, L.E.; Ornelas-Paz, J.J.; Del-Toro-Sánchez, C.L.; Márquez-Ríos, E.; López-Mata, M.A.; Rodríguez-Félix, F. (2018).Evaluation of Antioxidant Capacity, Protective Effect on Human Erythrocytes and Phenolic Compound Identification in Two Varieties of Plum Fruit (*Spondias spp.*) by UPLC-MS. *Molecules*, 23,1-14.
- Herrera-Flores T.S., Delgado-Alvarado A., Ramírez-Carrasco P., Licea de Anda E.M., Moreno-Contreras M.G., Machuca-Chavez C.P. (2014). Estudio de la composición proximal de variedades de garbanzo (*Cicer arietinum L.*) Costa 2004 y Blanoro. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2, 9-15.
- Horn-Ross, P.L.; John, E.M.; Canchola, A.J.; Stewart, S.L.; Lee, M.M.(2003) Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1158-1164.
- Iturralde-García, R.D.; Borboa-Flores, J.; Cinco-Moroyoqui, F.J.; Riudavets, J.; Del Toro-Sánchez, C.L.; Rueda-Puente, E.O.; Martínez-Cruz, O.; Wong-Corral F.J. (2016).Effect of controlled atmospheres on the insect *Callosobruchus maculatus* Fab. in stored chickpea. *Journal of Stored Products Research*, 69, 78-85.
- Johnny, S; Razavi, S.M.; Khodaei, D. (2015). Hydration kinetics and physical properties of split chickpea as affected by soaking temperature and time. *Journal of Food Science Technology* , 52(12), 8377-82.
- Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., y Chibbar R.N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum L.*): a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11-S26.
- Khan A., Singh P., Srivastava A. (2018).Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-Siderophore: Reviw. *Microbiological Research*, 212213,103-111.
- Koehnlein, E.A.; Koehnlein, E.M.; Carvalho-Gomes, R.; Sayuri-Nishida, V.; Gesser-Correa, V.; Bracht, A.; Peralta, R.M. (2016).Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Composition and Analysis* , 67 (6), 614-623.
- Kumar S., Gautam S. (2019). A combination process to ensure microbiological safety, extend storage life and reduce anti-nutritional factors in legume sprouts. *Food Bioscience*, 27, 18-19.

- Lafarga, T.; Villaró, S.; Bobo G.; Simó, J.; Aguiló-Aguayo, I. (2019). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in cooked pulses. *International Journal of Food Science Technology*.
- Larkin T., Price W.E., Astheimer L.(2008). The key Importance of Soy Isoflavone Bioavailability to Understanding Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 538-552.
- Liazid A., Plama M., Brigui J., Barroso C.G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140, 29–34.
- Lissau B., Bjarne P.P., Riber B.P., Budolfsen G. (1997) Safety evaluation of a fungal pectinesterase enzyme preparation and its use in food. *Food additives and contaminants*, 15 (6), 627-636.
- Liu S.Q., Holland R., Crow V.L. (2004). Esteres and their biosynthesis in fermented dairy products. *Internacional Dairy Journal*, 14(11), 923-945.
- Loo Y.T., Howell K., Chan M., Zhang P., Ng K.(2020). Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods.*Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19, 1268-1298.
- Lozano A., López E. (2001) Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus Niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3 (2), 85-91.
- Lu, J, Jin Y, Liu G, Zhu N, Gui, M, Yu A, Li, X (2010) Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 205-208.
- Lucas-González, R.; Navarro-Coves, S.; Pérez-Alvarez, J.; Fernández-López; Muñoz, A.L.; Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 94, 774-782.
- Lucas-González, R.; Viuda-Martos, M.; Pérez-Alvarez, J.; Fernández-López.(2018). Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 256, 252-258.
- Maldonado-Cervantes, E., Huerta-Ocampo, J. A., Montero-Morán, G. M., Barrera-Pacheco, A., Espitia-Rangel, E., & Barba de la Rosa, A. P. (2014). Characterization of *Amaranthus cruentus* L. seed proteins by 2-DE and LC/MS–MS: Identification and cloning of a novel late embryogenesis-abundant protein. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 172-178.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79,727-47.

- Maninder, K.; Narpinder, S.; Navdeep, S.S. Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars.(2005). *Journal of Food Engineering*, 69, 511-517.
- Marconi, E.; Ruggeri, S.; Cappelloni, M.; Leonardi, D.; Carnovale, E.(2000) Physicochemical, nutritional, and microstructural characteristics of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) following microwave cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5986-5994.
- Marín L., Miguélez E.M, VVillar C.J., Lombó F.(2015). Bioavailability of Dietary Polyphenols Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*, 3,1-18.
- McCann, SE.; Freudenheim, J.L.; Marshall, J.R.; Graham, S. (2003). Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *Journal of Nutrition*, 133, 193,7-1942.
- Melini,V.; Melini, F.; Acquistucci, R. Phenolic Compounds and Bioaccessibility Thereof in Functional Pasta. (2020). *Antioxidants*, 9, 343-373.
- Mercado-Mercado G., De la Rosa L.A., Alvarez-Padilla.(2020) Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal of molecular structure*, 1199, 126967.
- Michel-Aceves R.J., Izeta-Gutiérrez A. C., Torres-Alarcón G., Michel-Izetal A.C.M. (2017). La microbiota y el microbioma intestinal humano. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). *Revista de Sanidad Militar*, 71 (5), 443-448.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2), 211–219.
- Moser S., Aragon I., Furrer A., Van Klinken L.W.,Kaczmarczyk M., Lee B.H., George J., Hamaker B.R., Mattes R., Ferruzzi M.G. (2018). Potato phenolics impact starch digestion and glucose transport in model systems but translation to phenolic rich potato chips results in only modest modification of glycemic response in human. *Nutrition Research*, 52, 57-70.
- Mtolo, M.; Gerrano, A.; Mellem, J. (2017). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *Journal of Food* , 15 (3), 391-399.
- Muy R. M. D., Verdugo P. M., Osuna E., T., Baéz S. M. A., Basilio H. J., Valdez T.,B., contreras M. R., Sañudo B., J., A., campos. J. P., (2011) Caracterización del garbanzo verde

(*Cicer arietinum*) y tecnologías poscosecha para mantener su calidad. *Revista Chapingo Horticultura*, 17(1), 39-45.

Niño-Medina G., Muy-Rangel D., Garza-Juárez A., Vázquez-Rodríguez J.A., Méndez-Zamora G., Urías-Orona V. (2017). Composición nutricional, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de cascarilla de garbanzo (*Cicer arietinum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67, 68-73.

NOM-253-SSA1-2012. Norma Oficial Mexicana Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. Disponible en: <http://www.cnts.salud.gob.mx/descargas/NOM-253-SSA1-2012.pdf>

Nordlund E., Aura A.M., Mattila I., Kóssó T. Rouau X.Poutanen K. (2012). Formation of phenolic microbial metabolites and short-chain fatty acids from rye, wheat and oat bran and their fractions in the metabolic in vitro colon model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8134-8145.

Ortega-Moo, C.; Garza, J.; Vargas, R. (2016). The substituent effect on the antioxidant capacity of catechols and resorcinols. *Theoretical Chemistry Accounts*, 135-177.

Ospina-Meneses S.M., Caratgena-Valenzuela J.R.(2008). La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2), 112-123.

Ou K., Sarnoski P., Schneider K.R., Song K., Khoo C., Gu L.(2014). Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 2196-2205.

Ouazib, M.; Dura, A.; Zaidi, F.; Rosell, C.M. (2016). Effect of partial substitution of wheat flour by processed (germinated, toasted, cooked) chickpea on bread quality. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4(1), 8-18.

Park J.J., Lee J.J., Olawuyi I.F., Lee W.(2019). Effect of argon and nitrogen based modified atmosphere packaging on shiitake mushroom quality. *Korean Journal of Food Preservation*, 26(4), 391-398.

Pasinetti M.G., Singh R., Westfall S., Herman F., Faith J., Ho L. (2018). The Role of the Gut Microbiota in the Metabolism of Polyphenols as Characterized by Gnotobiotic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*.

Patané, C.; Iacoponi, E.; Raccuia, S.A. (2004). Physico-chemical characteristics, water absorption, soaking and cooking properties of some sicilian populations of chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Food Science Nutrition*, 55 (7), 547-554.

Perez-Perez L.M., García-Borbón L., González-Vega R.I., Rodríguez-Figueroa J.C., Rosas-Burgos E.C., Huerta-Ocampo J.A., Ruiz-Cruz S., Wong-Corral F.J., Borboa-Flores J., Rueda-Puente E.O., Del-Toro-Sánchez C.L. (2018). Liberación de compuestos

- enólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) utilizando microbiota humana intestinal. *Biotecnia*, 20(3), 146-154.
- Perez-Perez, L. M.; Armenta-Villegas, L.; Santacruz-Ortega, H.; Gutiérrez-Lomelí, M.; Aguilar, J. A.; Reynoso-Marin, F. J.; Robles-García, M. A.; Robles-Zepeda, R. E.; Ruiz-Cruz, S.; Del-Toro-Sánchez, C. L. (2017). Characterization of Anemopsis californica essential oil- β -cyclodextrin inclusion complex as antioxidant prolonged-release system. *Chemical Papers*, 71,1331–1342.
- Pittaway, J. K., Robertson, I. K., Ball, M. J. (2008). Chickpeas May Influence Fatty Acid and Fiber Intake in an Ad Libitum Diet, Leading to Small Improvements in Serum Lipid Profile and Glycemic Control. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(6), 1009–1013.
- Polak R., Phillips E., Campbell A. (2015). Legumes: Health Benefits and Culinary Approches to Increase Intake. *American Diabetes Association*, 33 (4), 198-205.
- Polo-Chávez I.A. (2012). Determinación proximal de los principales componentes nutricionales de seis variedades de leguminosas: arveja, garbanzo, haba, lenteja, maní y soya. Disertación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Ponce-García N., Ramírez-Wong B., Torres-Chavez PI., Figueroa-Cárdenas JD., Serna-Saldívar SO., Cortez-Ochoa MO. (2013) Effect of the moisture content on the viscoelastic properties of individual wheat kernels evaluated by the uniaxial compression test under small strain. *Cereal Chemistry Journal*, 90, 558-563.
- Prasad K. (2000). Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *International Journal of Angiology*, 9(4), 220-225.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Pujolà, M., Farreras, A., y Casañas, F. (2007). Contenido de proteína y almidón de frijoles crudos, remojados y cocidos (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 102 (4), 1034-1041.
- Quintero-Soto M.F., Saracho-Peña A.G., Chavez-Ontiveros J., Garzon-Tiznado J.A., Pineda-Hidalgo K.V., Delgado-Vargas F., Lopez-Valenzuela J.A. (2018). Phenolic profiles and their contribution to the antioxidant activity of selected chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT collections. *Plant Food for Human Nutrition*, 73, 122-129.
- Quirós-Sauceda A.E., Palafox H., Robles-Sánchez R.M., González-Aguilar G.A. (2012). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Biotecnia*, 18(3), 3-11.

- Re R, Pellegrini N, Protoggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rechner, A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212–225.
- Reyes-Moreno C., Milán-Carrillo J., Rouzaud-Sandez J., Garzón-Tiznado y Rosalba Mora-Escobedo R. (2002). Descascarillado/Suavización/Extrusión Alternativa Tecnológica Para Mejorar La Calidad Nutricional Del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Agrociencia* 36, 181-189.
- Rocchetti G., Lucini L., Chiodelli G., Giuberti G., Gallo A., Masoero F., Trevisan M.(2017). Phenolic profile and fermentation patterns of different comercial gluten-free pasta during in vitro large intestine fermentation. *Food Research International*, 97, 78-86.
- Rodríguez-Roque J.M., Grigelmo-Miguel N., Rojas-Grau M.A., Martín Belloso O. (2012). Métodos para determinar la capacidad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos. *Antioxidantes en Alimentos y Salud*.
- Romero-Baranzini, A.; Falcón, V.M.; Barrón, H.J.; Silveira, G.M.; Alfaro, R.R. (2014). Evaluación de color del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por métodos instrumentales y sensoriales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 27, 323-335.
- Sajja B.S., Samineni S., Gaur P.M. (2017). Botany of Chickpea. The Chickpea Genome, Compendium of Plants Genomes. *Springer International Publishing*.13-14.
- Segev A., Badani H., Galili L., Hovav R., Kapulnik Y., Shomer I., Galili S. (2012). Effects of Baking, Roasting and Frying on Total Polyphenols and Antioxidant Activity in Colored Chickpea Seeds. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 369-376.
- Shahidi F., Ambigaipalan P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidants activity and health effects A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Shahidi, F.; Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.
- Sharma, OP, y Bhat, TK (2009). Análisis de antioxidantes DPPH revisado. *Química de los alimentos*. 113 (4), 1202-1205.
- Shen X., Zhang M., Devahastin S., Guo Z, (2019), Effects of pressurized argon and nitrogen treatments in combination with modified atmosphere on quality characteristics of fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 159-165.

- Shin, M.K.; Jeon, Y.D.; Jin, J.S. (2019). Apoptotic effect of enterodiol, the final metabolite of edible lignans, in colorectal cancer cells. *Journal of Science Food and Agriculture*, 30, 99(5), 2411-2419.
- SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available in: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Silva-Cristóbal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., y Bello-Pérez, LA (2010). Composición química, digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de frijoles negros cocidos, garbanzos y lentejas. Variedades mexicanas Composición química, digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de variedades mexicanas cocidas de frijol negro, garbanzo y lenteja. *Cyta – Journal of Food*.8 (1),7-14.
- Sing, K.B.; Williams, P.C.; Nakkoul, H. (1990). Influence of growing season, location and planting time on some quality parameters of Kabuli chickpea. *Journal of Science Food and Agriculture*, 53, 429-441.
- Singh B. Singh J.P., Kaur A., Singh N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seed: A review. *Food Research International*, 101,1-16.
- Snelders J., Olaerts H., Dornez E., Van de Wiele T., Aura A.M., Vanhaecke L., Delcour J.A. Courtin C.M. (2014). Structural features and feruloylation modulate the fermentability and evolution of antioxidant properties of arabinoxylan oligosaccharides. *Journal of functional foods*, 10, 1-12.
- Soobrattee M., V. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. Aruoma y T. Bahorun. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213.
- Stevens Y., Van Rymenant E., Grootaert C., Van Camp J., Possemiers S., Masclee A., Jonkers D.(2019). The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health. *Nutrients*, 11, 1464.
- Summo C., De Angelis D., Ricciardi L., Caponio F., Lotti C., Pavan S, Pasqualone A. (2019). Data on the chemical composition, bioactive compounds, fatty acid composition, physicochemical and functional properties of a global chickpea collection. *Data in Brief*, 27, 104612.
- Sun, Y.; Deng, Z.; Lui, R.; Zhang, H.; Jiang, L.; Tsao, R. (2020). A comprehensive profiling of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in red and green lentil processing by-products. *Food Chemistry*, 325, 126925.
- Uniprot 2002-2020 disponible: <https://www.uniprot.org/>

- Velickovic C., Stanic-Vucinic D. (2018). The role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science*, 17, 81-103
- Von Gadov A., Joubert E., Hansmann C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 632–638.
- Wang X., Li Z.M., Li Q., Shi M., Bao L., Xu D., Li Z. (2019). Purification and biochemical characterization of FrsA protein from *Vibrio vulnificus* as an esterase. *Plos One*, 14(4), 1-13.
- Wang Y.K., Zhang Xin, Chen G.L., Yu J., Yang L.Q., Gao Y.Q. (2016). Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. *Journal of Functional Foods*, 24, 359-372.
- Xiang, J.; Apea-Bah, F.R.B.; Ndolo, V.U.; Katundu, M.C.; Beta, T. (2019). Profile of phenolic compounds and antioxidant activity of finger millet varieties. *Food Chemistry*, 275, 361-368.
- Xu M., Rao J., Chen B. (2019). (1) Phenolic compounds in germinated cereal and pulse seeds: Classification, transformation, and metabolic process. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 1-20.
- Xu, M.; Jin, Z.; Ohm, J.B.; Schwarz, P.; Rao, J.; Chen, B. (2019). (2) Effect of germination time on antioxidative activity and composition of yellow pea soluble free and polar soluble bound phenolic compounds. *Food Functional*, 10, 6840-6850.
- Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G.-I., Nishioka I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213–222.
- Zeinab T.A.S., Nesrin N.F., Farag M. (2020). How do biocatalysis and biotransformation affect Citrus dietary flavonoids chemistry and bioactivity? A review. *Critical Reviews in Biotechnology*.
- Zhao, M.; Yang, Q.; Lin, L.; Sun, B.; Wang, Y. (2017). Intracellular antioxidant activities of selected cereal phenolic extracts and mechanisms underlying the protective effects of adlay phenolic extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Journal of Functional Foods*, 31, 160-171.
- Zhu, L.; Li, W.; Deng, Z.; Li, H.; Zhang, B. (2020). The Composition and Antioxidant Activity of Bound Phenolics in Three Legumes, and Their Metabolism and Bioaccessibility of Gastrointestinal Tract. *Foods*, 9, 1815-1838.