

Biofortification of chickpeas with selenium (Se) and zinc (Zn): impact on their biological functionality

David Balderrama Ontiveros¹; Emilio López Millán^{1,2}; Sayra N. Serrano Sandoval¹^{*}; Marilena Antunes Ricardo^{1,2}^{*}

¹Tecnologico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL, 64849, México, a01749863@tec.mx

²Tecnologico de Monterrey, Institute for Obesity Research, Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, 64849 Monterrey, NL, México, a00843448@tec.mx, *marilena.antunes@tec.mx

Abstract– Zinc (Zn) and selenium (Se) are essential micronutrients for optimal growth, cognitive function, cellular self-regulation, and overall functioning in humans. The objective of this study was to evaluate the impact of biofortification of chickpeas with Zn and Se on their antioxidant, antihypertensive, and anti-inflammatory properties. Biofortification was carried out by germination with the following salts: control, Na_2SeO_3 , ZnSO_4 , ZnSeO_3 , and $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{ZnSO}_4$. The sprouts obtained were processed to obtain chickpea flours, which were then subjected to simulated gastrointestinal digestion. In terms of mineral incorporation, Na_2SeO_3 , ZnSeO_3 , and $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{ZnSO}_4$ treatments showed an increase by 82% to 205% in Se incorporation in chickpea flour compared to the control, while the Zn content increased by 9- and 2-times in the ZnSO_4 and ZnSeO_3 treatments, respectively, compared to the control. Likewise, treatment with Na_2SeO_3 resulted in higher concentrations of biocanin A glycoside, malonylated biocanin A glycoside, and biocanin A. The combination of Se and Zn during germination increased the antioxidant, antihypertensive, and anti-inflammatory properties of chickpea sprouts, compared to treatments germinated in the presence of the salts independently. The combination of Se and Zn during the germination process could become an effective and economical strategy for mineral fortification in novel foods, improving the bioavailability of these minerals and the functional characteristics of the food.

Keywords-- *Cicer arietinum*; inflammation; isoflavones; micronutrients; biofortification.

Biofortificación del garbanzo con selenio (Se) y zinc (Zn): impacto en su funcionalidad biológica

David Balderrama Ontiveros¹; Emilio López Millán^{1,2}; Sayra N. Serrano Sandoval¹*; Marilena Antunes Ricardo^{1,2}

¹Tecnologico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL, 64849, México, a01749863@tec.mx

²Tecnologico de Monterrey, Institute for Obesity Research, Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, 64849 Monterrey, NL, México, a00843448@tec.mx, *marilena.antunes@tec.mx

Resumen— El zinc (Zn) y el selenio (Se) forman parte de los micronutrientes esenciales para un crecimiento óptimo, las funciones cognitivas, la autorregulación celular y el funcionamiento general en el ser humano. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la biofortificación del garbanzo con Zn y Se en sus propiedades antioxidantes, antihipertensivas y antiinflamatorias. La biofortificación se llevó a cabo mediante germinación con las siguientes sales: control, Na_2SeO_3 , ZnSO_4 , ZnSeO_3 , y $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{ZnSO}_4$. Los germinados obtenidos fueron procesados para obtener harinas de garbanzo, que posteriormente fueron sometidas a una digestión gastrointestinal simulada. En cuanto a la incorporación de minerales, los tratamientos Na_2SeO_3 , ZnSeO_3 y $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{ZnSO}_4$ mostraron un incremento del 82% al 205% en la incorporación de Se en la semilla respecto al control, mientras que el contenido de Zn se incrementó en 9% y 2% en los tratamientos con ZnSO_4 y ZnSeO_3 , respectivamente, en comparación con el control. Asimismo, el tratamiento con Na_2SeO_3 presentó mayores concentraciones de biocanina A glucósido, biocanina A glucósido malonidado y biocanina A. La combinación de Se y Zn durante la germinación incrementó las propiedades antioxidantes, antihipertensivas, y antiinflamatorias de los digeridos de garbanzo, en comparación con los tratamientos germinados en presencia de las sales de forma independiente. La combinación de Se y Zn durante el proceso de germinación podría convertirse en una estrategia efectiva y económica para la fortificación de minerales en nuevos alimentos, mejorando la biodisponibilidad de estos minerales y las características funcionales del alimento.

Palabras clave: *Cicer arietinum*; inflamación; isoflavonas; micronutrientes; biofortificación.

I. INTRODUCCIÓN

A raíz del impacto de la pandemia de COVID-19, las autoridades sanitarias han incrementado sus esfuerzos para fomentar estilos de vida saludables y/o ofrecer alternativas que fortalezcan el sistema inmunológico humano [1]. Algunos minerales que han atraído el interés de los investigadores por su potencial efecto sobre el sistema inmune son el zinc (Zn) y el selenio (Se). Se ha clasificado como un agente químico preventivo del cáncer, con la capacidad de reducir el riesgo, retrasar la progresión y evitar la proliferación de este [2]. Por otro lado, al ser un micronutriente esencial, está involucrado en una gran mayoría de las rutas metabólicas. Principalmente aquellas relacionadas con el daño por oxidación, y está

implicado en el proceso de regulación de los sistemas inmune y reproductivo. Mientras que en las plantas el (Se) incrementa la producción de aminoácidos esenciales, como la selenocisteína y la selenometionina [3], [4]. Se cree que alrededor de un billón de personas alrededor del mundo cuentan con deficiencia de Se en sus dietas, esto puede llevar a que dichas personas contraigan enfermedades que pongan en riesgo su salud. Estas enfermedades conllevan efectos como la declinación de las funciones cognitivas, fallas en la respuesta del sistema inmunológico ante el ataque de patógenos, al como un aumento de las probabilidades de falla cardíaca en adultos [5], [6], [7].

Otro mineral de suma importancia que también se encuentra en deficiencia es el Zn. Este mineral ha sido ampliamente utilizado desde hace tiempo para el tratamiento de la diabetes mediante su inducción en agua y en los derivados de proteínas de Zn. El Zn también es conocido por regular y desarrollar al sistema inmune, principalmente al favorecer la maduración de linfocitos y células T [8]. Presenta actividad antiinflamatoria a través de la regulación de citocinas, interleucinas, entre otros varios elementos, provee de actividad antioxidante, retardando los procesos de oxidación a través de la activación de proteínas antioxidantes. Además, posee actividad antiviral contra el virus del herpes simple, el rinovirus, la influenza, el coronavirus, entre otros, regula la funcionalidad y la estructura de las proteínas. El Zn también juega un papel importante en la expresión génica, en el control de la actividad celular y en la aplicación contra la diabetes, donde, según estudios clínicos, ha demostrado un efecto potenciador de la insulina [8], [9]. Se estima que cerca del 17% de la población mundial presenta deficiencias de Zn derivadas de una ingesta insuficiente, principalmente en países de ingresos medios y bajos. Este déficit incrementa la susceptibilidad a infecciones y retrasa el crecimiento y el desarrollo físico y neurológico [10].

Una estrategia para satisfacer estas demandas de micronutrientes ha sido la fortificación de alimentos con diversos minerales y vitaminas. Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta práctica es la baja biodisponibilidad que estos presentan en el organismo, lo que limita su funcionalidad biológica [11]. Una alternativa a esta

limitación es la biofortificación de alimentos mediante la germinación, en la que el micronutriente se incorpora a través de las membranas vegetales y tiende a interactuar o unirse a proteínas, incrementando su estabilidad y mejorando su biodisponibilidad [12]. Actualmente se sabe que inducir sales de (Se) durante la germinación de ciertas leguminosas podría incrementar en gran medida la cantidad de proteínas relacionadas con dicho mineral en la semilla [4], lo que dotaría de un incremento sustancial en el contenido proteico, en su valor nutricional y en sus potenciales actividades benéficas para la salud. Una de las alternativas alimentarias más estudiadas en este sentido ha sido el garbanzo, debido a que es una leguminosa de alto valor biológico, con alto contenido de proteínas (18-29%), lípidos (4-7%) y carbohidratos (50-60%). Estudios sobre procesos de biofortificación de micronutrientes en garbanzo han mostrado un incremento en su perfil de isoflavonas, moléculas asociadas con efectos cardioprotectores, antioxidantes, antiinflamatorios y moduladores hormonales, lo que contribuye a mantener o mejorar el buen estado de salud.

Tomando en consideración lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la biofortificación con Zn y Se de harinas de garbanzo sobre sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antihipertensivas, tras ser sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulada.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material Biológico

Para la realización de este proyecto se usó garbanzo comercial adquirido en el mercado de abastos del municipio de Guadalupe, en el estado de Nuevo León. Las semillas se limpiaron de forma manual para eliminar impureza, se separaron aquellas que presentaran daños y se almacenaron en bolsas a -20 °C.

B. Germinación a escala industrial

La desinfección y germinación se llevaron a cabo a nivel industrial dentro de la empresa “Alimentos Lee” a una temperatura de 19 °C y a una humedad relativa del 80%. A continuación, se presentan las condiciones de remojo y germinación (TABLA I).

TABLA I
DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA GERMINACIÓN DEL GARBANZO A ESCALA INDUSTRIAL

Tratamiento	Concentraciones	Condiciones de Hidratación
Control	166 g/L Agua (1:3 p/v)	Riego cada 4 h
Na ₂ SeO ₃	24 mg/L (1:3 p/v)	Riego cada 4 h
ZnSO ₄	480 mg/L (1:3 p/v)	Riego cada 4 h
ZnSeO ₃	24 mg/L (1:3 p/v)	Riego cada 4 h

Na ₂ SeO ₃ +ZnSO ₄	12 mg/L + 240 mg/L (1:3 p/v)	Riego cada 4 h
---	------------------------------	----------------

C. Caracterización morfológica

Después del periodo de germinación se midió la radícula de los germinados usando un vernier para medir el crecimiento de este con el objetivo de poder medir el efecto que tienen dichos minerales en el crecimiento morfológico del garbanzo en milímetros (mm). y se guardaron los germinados las semillas de garbanzo germinadas en bolsas de plástico a -80 °C para mantener las propiedades hasta su uso.

D. Cuantificación de Isoflavonas

La cuantificación de isoflavonas se llevó a cabo tomando como referencia la metodología establecida por [13] en un HPLC-DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, BW). Los compuestos fueron separados en una columna reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (3.0 mm ID X 150 mm, 3.5 µm, 30 °C, con un flujo de 0.4 mL/min). Se usó agua acidificada con 0.1 % de ácido fórmico como fase (A) y acetonitrilo como fase (B). Se utilizó la biocanina A como estándar para cuantificar las isoflavonas. La concentración de los conjugados de biocanina A se expresó como equivalente de Biocanina A (µg/g peso seco). Las isoflavonas se detectaron a 260 nm.

E. Análisis de Se y Zn mediante absorción atómica y método interno INS-SM/US-71

La cuantificación del zinc (Zn) se realizó mediante absorción atómica, según lo establecido en la NOM-117-SSA1-1994. En el caso de la cuantificación del selenio (Se) se utilizó el método interno INS-SM/US-71 de la empresa Becar Laboratories. Ambas metodologías fueron llevadas a cabo por un laboratorio externo certificado.

F. Digestión gastrointestinal simulada

Para llevar a cabo la digestión gastrointestinal, se llevó a cabo la metodología descrita en [14] donde se simularon los modelos de la boca, el estómago y el intestino. En dichas simulaciones se usaron diferentes fases con composiciones representativas de la saliva, jugo gástrico, biliar y duodenal.

Para la digestión se consideraron los siguientes volúmenes para 3.5 g de muestra; 6 mL de fase salival, la cual se mezcló durante 5 min, 12 mL de fase gástrica que fue mezclada durante 2 h, 12 mL de fase duodenal + 6 mL de fase biliar, mezcladas durante 2 h. Todas las mezclas se realizaron a 200 rpm, simulando los movimientos gastrointestinales, a 37 °C. En la TABLA II se detalla la composición de cada fase empleada en el proceso de digestión simulada.

G. Evaluación del efecto antioxidante mediante la inhibición de la captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

DPPH es un método de análisis antioxidante que aprovecha la capacidad de este radical de captar radicales libres, oxidándose y perdiendo su color inicial [15]. Se hicieron reaccionar en una placa de 96 pozos y en proporción 1:1 (v/v), 50 μ L de 60 μ M de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) previamente solubilizado en metanol y 50 μ L de muestra. Posteriormente se incubó la placa a 37 °C durante 1 hora. La absorbancia fue medida a 515 nm usando un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, Winooski, VM) y se usó agua como blanco. Una vez se obtuvieron los datos, se utilizaron para calcular la inhibición de la capacidad de DPPH para captar radicales libres mediante (1).

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = \frac{\text{ABS}_{\text{blanco}} - \text{ABS}_{\text{muestra}}}{\text{ABS}_{\text{blanco}}} \times 100 \quad (1)$$

Donde $\text{ABS}_{\text{blanco}}$ corresponde a la absorbancia del blanco y $\text{ABS}_{\text{muestra}}$, a la absorbancia de la muestra.

TABLA II
COMPOSICIÓN DE CADA UNA DE LAS FASES DE LA DIGESTIÓN
GASTROINTESTINAL SIMULADA

Salivar	Gástrica	Biliar	Duodenal
100 ml agua	200 ml agua	100 ml agua	200 ml agua
11.7 mg NaCl	1.1008 g NaCl	1.0518 g NaCl	2.804 g NaCl
14.9 mg KCl	0.3296 g KCl	0.0752 g KCl	0.2256 g KCl
0.81 g NaHCO ₃	0.1064 g NaH ₂ PO ₄	1.157 g NaHCO ₃	1.3552 g NaHCO ₃
0.04 g Urea	0.1596 g CaCl ₂ *2H ₂ O	0.05 g Urea	32 mg KH ₂ PO ₄
	0.1224 g NH ₄ Cl		20 mg MgCl ₂
	0.034 g Urea		0.04 g Urea
	2.6 mL HCl conc	0.03 mL HCl conc	0.072 mL HCl conc
0.1 g Mucina	1 g Pepsina	6 g de sales biliares	3.6 g Pancreatina
0.2 g alfa-amilasa	1.2 g Mucina		0.6 g Lipasa
pH	pH	pH	pH
6.8±0.2	1.3±0.02	8.2±0.2	8.1±0.2

H. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)

La inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se ha asociado con efectos antihipertensivos. Para esta determinación, se siguió lo reportado por [16], en el que se prepararon 60 μ L de la muestra y 80 μ L de hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL); posteriormente, se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Una vez terminada la incubación, se añadieron 10 μ L de la enzima ACE (25 mU/mL) y se incubó a 37 °C durante 80 minutos. La

reacción se terminó añadiendo 110 μ L de HCl (1 M) a la mezcla con 1.5 mL de acetato de etilo para realizar una extracción de ácido hipúrico. Se centrifugó a 1400 xg durante 10 minutos y se recolectaron 800 μ L para evaporar. Finalmente, el evaporado se resuspendió en 250 μ L, la absorbancia se leyó en una placa de cuarzo a 228 nm y se analizó usando (2).

$$\text{Inhibición de ACE (\%)} = \left(\frac{(\text{A}_{\text{C}+} - \text{A}_{\text{blanco}}) - (\text{A}_{\text{muestra}} - \text{A}_{\text{C}-})}{(\text{A}_{\text{C}+} - \text{A}_{\text{blanco}})} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde $\text{A}_{\text{C}+}$ corresponde a la absorbancia del control positivo, A_{blanco} a la absorbancia del blanco, $\text{A}_{\text{muestra}}$ a la absorbancia de la muestra y $\text{A}_{\text{C}-}$ a la absorbancia del control negativo.

I. Evaluación de la producción de óxido nítrico como biomarcador de la respuesta inflamatoria

Para la medición de óxido nítrico se utilizó la metodología reportada por [17], en la que se cultivó la línea celular de macrófagos de ratón (RAW 264.7), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Dichas células se cultivaron en cajas de Petri con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12) con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂; posteriormente, se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 500000 células/mL. Después de 24 horas, se añadieron diferentes tratamientos a una concentración final de 1 mg/mL durante 4 horas. Al final de este periodo, la mitad de las células fue estimulada con lipopolisacáridos de *E. coli* O111:B4 (LPS) a 1 μ g/mL, mientras que la otra mitad se usó como control de la respuesta inflamatoria. Después de 18 h de incubación, 100 μ L de sobrenadante se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos para medir la absorbancia de nitritos con el Griess Reagent System (Promega, Madison, WI) a 550 nm. La concentración de óxido nítrico se midió mediante una curva de nitritos, que son productos no volátiles de su formación. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la producción de óxido nítrico, de acuerdo con (3). El remanente de células y del medio de la placa original se utilizó para medir la viabilidad celular.

$$\text{Producción óxido nítrico (\%)} = \left(\frac{(\text{M}_{\text{LPS}+} - \text{M}_{\text{LPS}-})}{(\text{C}_{\text{LPS}+} - \text{C}_{\text{LPS}-})} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde $\text{M}_{\text{LPS}+}$ corresponde a la absorbancia de las células tratadas y estimuladas con LPS, mientras que M_{LPS} corresponde a la absorbancia de las células tratadas con la misma muestra, pero sin estímulo con LPS. Asimismo, $\text{C}_{\text{LPS}+}$ corresponde a la absorbancia de las células control o no

tratadas estimuladas con LPS y C_{LPS}. a la absorbancia de las células control o no tratadas estimuladas con LPS.

En cuanto a la viabilidad de las células, se determinó usando el protocolo CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Madison, WI), y se midió en el espectrofotómetro a una absorbancia de 490 nm. La viabilidad se calculó mediante (4).

Viabilidad Celular (%)= $\frac{ABS_{muestra}}{ABS_{control}} \times 100$ (4)

Donde ABS_{muestra} corresponde a la absorbancia de las células tratadas con la muestra, mientras que ABS_{control} corresponde a la absorbancia de las células no tratadas (control).

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Crecimiento de radícula durante la germinación

Las semillas de garbanzo presentaron un crecimiento considerable, aunque las condiciones de germinación (19 °C) no fueran las óptimas reportadas por [4]. Se puede observar una diferencia significativa entre los tratamientos Na₂SeO₃, ZnSO₄ y Na₂SeO₃+ZnSO₄, en donde Na₂SeO₃ presentó un 29.08% más de crecimiento en comparación con el tratamiento de ZnSO₄. De igual forma, el tratamiento de Na₂SeO₃ exhibió un crecimiento 50.85% mayor de sus radículas en comparación con el tratamiento combinado de Na₂SeO₃+ZnSO₄. Los tratamientos de control (germinado y no biofortificado) y ZnSeO₃ no presentaron diferencias significativas entre sí (TABLA III).

TABLA III
CRECIMIENTO DE RADÍCULA DE LAS SEMILLAS DE GARBANZO POSTERIOR AL PERIODO DE GERMINACIÓN

Tratamiento	Tamaño Radícula (mm)
Control	3.94 ± 0.32 c
Na ₂ SeO ₃	6.43 ± 0.48 a
ZnSO ₄	4.56 ± 0.70 b
ZnSeO ₃	3.78 ± 0.65 c
Na ₂ SeO ₃ +ZnSO ₄	3.16 ± 0.79 d

^{a-d} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos usando la prueba de Tukey (p<0.05) (n=10).

B. Cuantificación de isoflavonas

Se puede observar en la TABLA IV que el contenido de biocanina A-glucósido, biocanina A-glucósido malonidado y biocanina A fue superior en el tratamiento con Na₂SeO₃ que en los demás tratamientos.

La concentración de biocanina A-glucósido, biocanina A-glucósido malonidado y biocanina A se incrementó en 52.71%, 39.52% y 30.87%, respectivamente, con respecto al control germinado. Esto coincide con lo reportado por [13] donde se explica que la incorporación de Se en los germinados de semillas de garbanzo incrementa su contenido de

compuestos fenólicos a través de la activación de algunas enzimas relacionadas con su biosíntesis.

C. Contenido de Se y Zn en las harinas de garbanzo germinado

Se puede observar que los tratamientos ZnSO₄ y ZnSeO₃ fueron los que lograron incorporar una mayor concentración de Zn en las semillas de garbanzo, incrementándola en 9 y 2 veces, respectivamente, en comparación con el control germinado (TABLA V). Asimismo, los tratamientos Na₂SeO₃, ZnSeO₃ y Na₂SeO₃+ZnSO₄ mostraron una mayor incorporación de Se en los germinados de semillas de garbanzo, incrementando su contenido en 82%, 205% y 123%, respectivamente. La mayor incorporación de Se en el garbanzo germinado con Na₂SeO₃ + ZnSO₄, en comparación con el tratamiento individual de Na₂SeO₃, podría explicarse por el rol de Zn, que actúa como termoestabilizador de las enzimas ATP sulfurilasas (ATPS), las cuales desempeñan un papel crucial en la incorporación de Se en el garbanzo [3].

TABLA IV
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN FINAL DE ISOFLAVONAS

Tratamiento	Biocanina A-glucósido	Biocanina A-glucósido malonidado	Biocanina A
	Concentración (µg/g de harina base seca)		
Control	93.49 ± 12.7 b	121.40 ± 6.7 b	66.35 ± 3.9 a
Na ₂ SeO ₃	197.70 ± 59.0 a	200.72 ± 42.0 a	95.98 ± 36.1 a
ZnSO ₄	106.93 ± 6.8 b	143.59 ± 2.4 ab	56.01 ± 0.2 a
ZnSeO ₃	77.91 ± 18.1 ab	122.07 ± 26.4 b	59.85 ± 18.1 a
Na ₂ SeO ₃ +ZnSO ₄	112.97 ± 7.3 b	148.93 ± 4.6 ab	93.86 ± 2.8 a

^aSe realizó una estadística ANOVA y pruebas post hoc comparando medias mediante Tukey, entre tratamientos para clasificarlos en grupos (p < 0.05).

TABLA V
CONCENTRACIÓN DE ZINC Y SELENIO EN LAS HARINAS DE GARBANZO GERMINADO DETERMINADA MEDIANTE ABSORCIÓN ATÓMICA

Tratamiento	Zinc (mg/kg)	Selenio (mg/kg)
Control	24.45	3.71
Na ₂ SeO ₃	25.35	6.77
ZnSO ₄	221.36	3.47
ZnSeO ₃	51.40	11.33
Na ₂ SeO ₃ +ZnSO ₄	27.74	8.28

D. Evaluación del efecto antioxidante mediante la inhibición de la captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

La inclusión de Se y/o Zn mejora las propiedades antioxidantes de las harinas germinadas de garbanzo con respecto al control. En primera instancia se puede observar como el tratamiento Na₂SeO₃+ZnSO₄ mostró un incremento significativo (p=0.0440) de la actividad antioxidante aproximadamente 3.75 veces en relación con el tratamiento control (Fig. 1). El tratamiento de ZnSeO₃, mostró un incremento significativo en la actividad antioxidante

($p=0.0302$) en relación con el control, mientras que no se encontró una diferencia significativa entre el control y los tratamientos de ZnSO_4 y Na_2SeO_3 . Por otro lado, la combinación de $\text{Na}_2\text{SeO}_3+\text{ZnSO}_4$ mostró un mayor potencial antioxidante que el uso individual de Na_2SeO_3 . No se observó diferencia significativa entre los tratamientos $\text{ZnSO}_4+\text{Na}_2\text{SeO}_3$ y ZnSeO_3 .

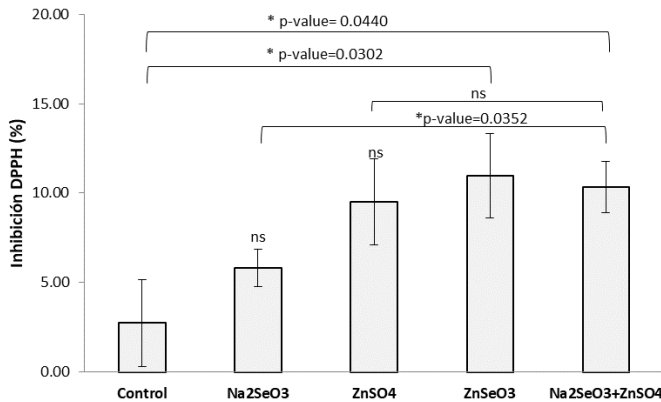


Fig 1. Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH en los digeridos de la harina de garbanzo germinada (5 mg/mL). Se realizó un análisis estadístico ANOVA comparando medias mediante Tukey y una prueba post hoc t-student ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la **Fig. 1**, todos los tratamientos muestran una tendencia a incrementar su capacidad antioxidante con la inclusión de Se y/o Zn durante la germinación. Se ha reportado que la germinación de semillas de garbanzo en presencia de Na_2SeO_3 inducía un incremento significativo en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, *por sus siglas en inglés*), precursora de la síntesis de compuestos fenólicos [18]. Asimismo, los autores demostraron que la germinación de semillas de garbanzo en presencia de 2 mg/mL de Na_2SeO_3 incrementó significativamente el contenido de isoflavonas, así como la actividad antioxidante.

Además, la germinación de semillas de garbanzo con 2 mg/mL de Na_2SeO_3 induce una mayor actividad antioxidante celular que la del control [4]. Esta actividad antioxidante parece concentrarse en las fracciones proteicas de glutelinas, donde se hipotetiza que, como producto de la digestión simulada, se generan aminoácidos correspondientes a la selenometionina y la selenocisteína, y estos juegan un papel fundamental en el efecto antioxidante. De igual manera, se observó que los tratamientos con Zn mostraron una capacidad antioxidante mayor que la del control, lo que sugiere una posible actividad del Zn como activador de redox derivada de su unión a iones sulfuro (tiolato) en aminoácidos como la cisteína [19].

E. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)

La inhibición de la ACE promueve un efecto antihipertensivo al dilatar las paredes capilares, lo que permite

una presión sanguínea adecuada. A las concentraciones evaluadas, se observó una diferencia en el efecto de los digeridos de harinas de garbanzo germinado sobre la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). A dosis bajas (5 mg/mL) los tratamientos de Na_2SeO_3 y ZnSeO_3 , mostraron una mayor inhibición de la actividad de la ACE (**Fig. 2**) mientras que a concentraciones superiores (10 mg/mL), el digerido de la harina de garbanzo germinada y biofortificada con ZnSeO_3 , mostró un incremento en su capacidad de inhibir la ACE y su efecto fue estadísticamente diferente de todos los demás tratamientos.

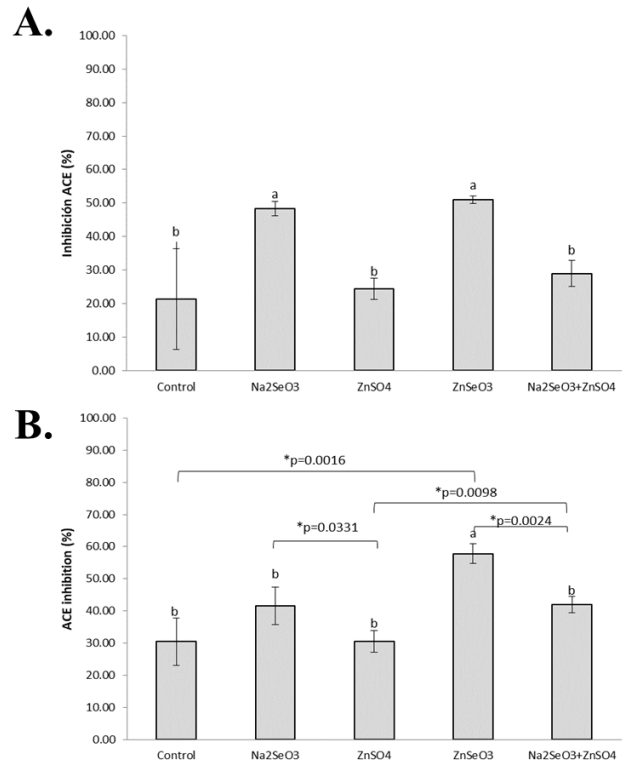


Fig. 2. Inhibición de la enzima inhibidora de la angiotensina (ACE) exhibida por digerir harinas de garbanzo germinado, evaluada a las concentraciones de A) 5 mg/mL, B) 10 mg/mL. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos usando la prueba de Tukey. * Indica diferencias estadísticamente significativas entre pares de medias analizadas con la prueba post hoc t-student ($p < 0.05$).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) mantiene una fuerte relación con la concentración de Zn, dado que es una metaloproteasa que requiere Zn en su sitio catalítico activo. Se hipotetiza que las proteínas o péptidos acoplados con Zn presentes en los digeridos de las harinas de garbanzo germinadas y biofortificadas con sales inorgánicas de zinc podrían acoplarse al sitio catalítico de la enzima, limitando su actividad [20]. Asimismo, el Se actúa como un regulador redox, reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que detonan el estrés oxidativo e inflamación e inducen la activación de la ACE, y, en consecuencia, es capaz de reducir su actividad [21].

F. Evaluación de la producción de óxido nítrico como biomarcador de la respuesta inflamatoria

El tratamiento control (germinado no biofortificado) no demostró diferencias significativas respecto a la producción de óxido nítrico en comparación con células no tratadas (**Fig. 3**). Todos los tratamientos redujeron significativamente la producción de óxido nítrico con respecto al control, con reducciones del 55% y 32% en las células tratadas con $\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{ZnSO}_4$ y ZnSeO_3 , respectivamente.

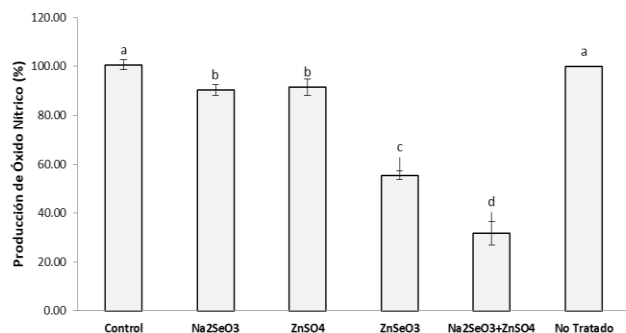


Fig 3. Producción de óxido nítrico en células de macrófagos de ratón (RAW 264.7) tratadas con digeridos de harina de garbanzo germinado (5mg/mL).

^{a-d} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos usando la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Esta reducción en la producción de óxido nítrico nos indica que estos tratamientos regulan la respuesta inflamatoria, disminuyendo la posible infiltración de otras células que desencadenan la cascada de mediadores de inflamación aguda. Se ha reportado que tanto el Zn como el Se pueden mitigar o inhibir al factor nuclear kappa Beta (NF- κ B), principal factor de transcripción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), isoforma de la enzima óxido nítrico sintasa con la consecuente reducción en la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , así como interleucinas (IL)-1 β e interleucina (IL)-6 [22].

IV. CONCLUSIÓN

En conclusión, la germinación de semillas de garbanzo con la combinación de fuentes inorgánicas de Se y Zn mostró un efecto significativo en el crecimiento radicular de las semillas. La presencia simultánea de selenio y zinc ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{ZnSO}_4$) favoreció la acumulación de Se en la semilla. Los digeridos de garbanzo germinado y biofortificados con ZnSeO_3 mostraron un incremento en la actividad antioxidante DPPH, siendo 3.75 veces mayor en el tratamiento que en el control. Asimismo, este tratamiento logró inhibir la actividad de la enzima angiotensina II, enzima relacionada con el proceso de vasoconstricción y la hipertensión arterial, en 1.9 veces con respecto al control germinado sin biofortificar. En conjunto, los resultados demuestran que la combinación de Se y Zn, durante el proceso de germinación del garbanzo, potencia sus propiedades biológicas antioxidantes, antihipertensivas y antiinflamatorias en comparación con la harina de garbanzo germinada y biofortificada de forma individual con cualquiera de estos

micronutrientes, incluso después de su digestión gastrointestinal, lo que indica su estabilidad funcional. La biofortificación combinada puede convertirse en una estrategia novedosa y económicamente factible para desarrollar alimentos más nutritivos, con propiedades benéficas para la salud.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Alimentos Lee el apoyo en el proceso de germinación a escala industrial. Esta investigación fue apoyada por el Challenge-Based Research Funding Program 2024 (CI_IOR_HLT_D_22) del Tecnológico de Monterrey y se desarrolló en las instalaciones del Centro de Biotecnología FEMSA de la Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey.

REFERENCIAS

- [1] M. Wyleżół *et al.*, "The Influence of obesity on nutrition and physical activity during COVID-19 pandemic: A case-control study", *Nutrients*, vol. 14, n.º 11, p. 2236, 2022, doi: 10.3390/nu14112236.
- [2] R. Kaur and K. Prasad, "Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*) - A review", *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 109, pp. 448-463, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.044.
- [3] M. Schiavon and E. A. H. Pilon-Smits, "The fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology", *New Phytol.*, vol. 213, n.º 4, pp. 1582-1596, 2017, doi: 10.1111/nph.14378.
- [4] S. N. Serrano-Sandoval, D. Guardado-Félix, and J. A. Gutiérrez-Urbe, "Changes in digestibility of proteins from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) germinated in presence of selenium and antioxidant capacity of hydrolysates", *Food Chem.*, vol. 285, pp. 290-295, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.137.
- [5] G. Björklund *et al.*, "Selenium: an antioxidant with a critical role in anti-aging", *Molecules*, vol. 27, n.º 19, p. 6613, 2022, doi: 10.3390/molecules27196613.
- [6] N. Hadrup and G. Ravn-Haren, "Acute human toxicity and mortality after selenium ingestion: A review", *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 58, p. 126435, 2020, doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126435.
- [7] L. Zhang *et al.*, "Benefit-risk assessment of dietary selenium and its associated metals intake in China (2017-2019): Is current selenium-rich agro-food safe enough?", *J. Hazard. Mater.*, vol. 398, p. 123224, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123224.
- [8] A. A. Oyagbemi *et al.*, "Potential health benefits of zinc supplementation for the management of COVID-19 pandemic", *J. Food Biochem.*, vol. 45, n.º 2, 2021, doi: 10.1111/jfbc.13604.
- [9] W. Maret, "Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life", *Adv. Nutr.*, vol. 4, n.º 1, pp. 82-91, 2013, doi: 10.3945/an.112.003038.
- [10] K. R. Wessells and K. H. Brown, "Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting", *PLoS ONE*, vol. 7, n.º 11, p. e50568, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0050568.
- [11] E. J. M. Joy, A. J. Stein, S. D. Young, E. L. Ander, M. J. Watts, and M. R. Broadley, "Zinc-enriched fertilisers as a potential public health intervention in Africa", *Plant Soil*, vol. 389, n.º 1-2, pp. 1-24, 2015, doi: 10.1007/s11104-015-2430-8.
- [12] A. Ullah, M. Farooq, A. Rehman, M. Hussain, and K. H. M. Siddique, "Zinc nutrition in chickpea (*Cicer arietinum*): a review", *Crop Pasture Sci.*, vol. 71, n.º 3, pp. 199-218, 2020, doi: 10.1071/CP19357.
- [13] S. N. Serrano-Sandoval, D. Guardado-Félix, y J. A. Gutiérrez-Urbe, "Deglycosylation of isoflavones in selenized germinated chickpea flours due to convection drying", *LWT*, vol. 153, p. 112417, 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112417.
- [14] F. P. Flores, R. K. Singh, W. L. Kerr, R. B. Pegg, and F. Kong, "Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion", *Food Chem.*, vol. 153, pp. 272-278, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.063.

- [15] B. P. Singh y S. Vij, "Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality", *LWT*, vol. 86, pp. 293-301, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.013.
- [16] J. Luo, C. Zhang, Q. Liu, S. Ou, L. Zhang, and X. Peng, "Combinative effect of sardine peptides and quercetin alleviates hypertension through inhibition of angiotensin I converting enzyme activity and inflammation", *Food Res. Int.*, vol. 100, pp. 579-585, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.019.
- [17] M. Antunes-Ricardo, J. A. Gutiérrez-Urbe, C. Martínez-Vitela, and S. O. Serna-Saldívar, "Topical anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica*", *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1-9, 2015, doi: 10.1155/2015/847320.
- [18] D. Guardado-Félix, S. O. Serna-Saldivar, E. O. Cuevas-Rodríguez, D. A. Jacobo-Velázquez, and J. A. Gutiérrez-Urbe, "Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts", *Food Chem.*, vol. 226, pp. 69-74, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.046.
- [19] A. S. Prasad and B. Bao, "Molecular Mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: clinical therapeutic implications", *Antioxidants*, vol. 8, n.º 6, p. 164, 2019, doi: 10.3390/antiox8060164.
- [20] J. Li, X. Huo, Y. Zheng, Y. Guo, and C. Feng, "ACE-inhibitory peptides identified from quinoa bran glutelin-2 hydrolysates: in silico screening and characterization, inhibition mechanisms of ace, coordination with zinc ions, and stability", *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 78, n.º 2, pp. 419-425, 2023, doi: 10.1007/s11130-023-01074-6.
- [21] Z. Yue *et al.*, "Identification, molecular docking mechanism and cellular activity of selenium-enriched ACE inhibitory peptides from oysters", *Molecules*, vol. 30, n.º 24, p. 4818, 2025, doi: 10.3390/molecules30244818.
- [22] A. Mahmoodpoor *et al.*, "The effects of selenium supplementation on inflammatory markers in critically ill patients", *SN Appl. Sci.*, vol. 4, n.º 12, p. 326, 2022, doi: 10.1007/s42452-022-05208-4.