



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Capacidad antioxidante y fitoquímicos de los  
germinados de *Vigna unguiculata* (L.) Walp  
biofortificados con hierro y zinc**

**T E S I S**

Para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**Amelio Eli Morales Morales**

**Director**

**Dr. César Márquez Quiroz**

**Asesores**

**Dr. José Rodolfo Velázquez Martínez**

**Dr. Efraín de la Cruz Lázaro**

**Dr. Esteban Sánchez Chávez**

**Villahermosa, Tabasco.**

**Febrero de 2017.**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN  
ACADÉMICA DE  
CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**ASUNTO:** El que se indica.

**OFICIO:** DACA-057

Villahermosa, Tabasco, a 21 de febrero de 2017

**ING. AMELIO ELÍ MORALES MORALES  
EGRESADO DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
PRESENTE**

Por este conducto y de acuerdo a su solicitud de autorización de impresión de Tesis, informo a ud. que sobre la base del Artículo 26 del reglamento de Posgrado de esta Universidad, esta Dirección a mi cargo le **autoriza la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de Tesis titulada "Capacidad antioxidante y fitoquímicos de los germinados de *Vigna unguiculata* biofortificados con hierro y zinc."

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

ATENTAMENTE

  
**DR. ROBERTO FLORES BELLO  
DIRECTOR**

U.J.A.T.



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN**

Miembro CUMEX desde 2008

  
**Consorcio de  
Universidades  
Mexicanas**  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

 C.c.p.- Archivo.

Km 25 de la carr. fed. 195, tramo Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86293, Centro, Tabasco, México  
Tel. -52 (993) 358 1500, extensión 6607  
Correo electrónico: [daca.cica@yahoo.com](mailto:daca.cica@yahoo.com)

[www.ujat.mx](http://www.ujat.mx)  
[www.facebook.com/ujat.mx](http://www.facebook.com/ujat.mx) | [www.twitter.com/ujat](http://www.twitter.com/ujat) | [www.youtube.com/UJATmx](http://www.youtube.com/UJATmx)

## CARTA AUTORIZACIÓN

La que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada “**Capacidad antioxidante y fitoquímicos de los germinados de *Vigna unguiculata* biofortificados con hierro y zinc**”, de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes mencionado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, a los 20 días del mes de febrero del año 2017.

**Autoriza**

Amelio Eli Morales Morales



---

Nombre y firma

## Dedicatorias

**Mama:** Te dedico este proyecto de vida, por estar conmigo en todo momento, cuando no tenía a quien acudir, sabía que podía contar contigo. Gracias por todo lo que has hecho por mi, cuando todos los caminos se cierran tu puerta es la única siempre abierta. y cuando todo es difícil ahí estas tú a mi lado diciéndome que todo saldría bien. Gracias Mamá por todo lo que hiciste, haces y por todo lo que serias capaz de hacer si te lo pidiera.

Con cariño y mucho amor para mi madre

**Hermanos:** No cabe duda que los primeros y mejores amigos son los hermanos, a pesar de la distancia están conmigo y juntos hemos llegado al final de otro objetivo, gracias por su apoyo y comprensión, este proyecto es de todos.

**Abuelos y tíos:** Agradezco a Dios por darme una extraordinaria familia, sin duda la mejor que pude haber tenido, este proyecto de vida es dedicado para ustedes porque nunca me han dejado de brindar su apoyo, siempre están al pendiente de mi, y de una u otra manera me apoyan, gracias por todo familia, los amo.

## Agradecimientos

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por medio de la División Académica de Ciencias Agropecuarias (DACA) por brindarme la oportunidad de continuar preparándome con mis estudios de maestría.

Al Dr. César Marquez Quiroz por brindarme su confianza y apoyo durante la realización de este proyecto que juntos hemos llegado al final.

Al comité de revisores por su aportación y sugerencias al trabajo, así mismo a todos los maestros que fueron parte de mi formación durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de manutención así mismo por el apoyo para la realización de una estancia académica durante el periodo de mis estudios de maestría.

A mis asesores, el Dr. José Rodolfo Velázquez y Dr. Efraim de la Cruz por brindarme su apoyo y aportación en este proyecto, así mismo al Dr. Adalberto Benavides de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de realizar parte de este trabajo en el laboratorio a su cargo y a la QFB Julia Medrano Macías por su apoyo durante la estancia.

No hay satisfacción más grande que conocer personas maravillosas y tener la dicha de convivir con ellos. Gracias a mis amigos por su amistad y compañerismo durante este tiempo en la maestría.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- JUSTIFICACIÓN .....	2
III.- OBJETIVOS .....	3
2.1.- Objetivo general .....	3
2.2.- Objetivos específicos .....	3
2.3.- Hipótesis .....	3
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
4.1.- Generalidades de las leguminosas .....	4
4.2.- Producción nacional de frijol .....	4
4.3.- Cultivo del frijol caupí .....	5
4.4.- Antioxidantes .....	6
4.5.- Fitoquímicos .....	7
4.5.1.- Fenoles totales .....	7
4.5.2.- Taninos .....	8
4.6.- Factores antinutricionales .....	9
4.6.1.- Ácido fítico .....	9
4.7.- Germinación .....	10
4.8.- Biofortificación .....	11
4.8.1.- Técnicas de biofortificación .....	11
4.9.- Importancia del zinc en plantas .....	12
4.10.- Zinc en humanos .....	13
4.11.- Hierro en las plantas .....	14
4.12.- Funciones del hierro en el hombre .....	14
V.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
5.1.- Área de estudio .....	16

5.2.- Obtención de semilla.....	16
5.3.- Producción de germinados.....	16
5.4.- Análisis estadístico y diseño experimental .....	17
5.5.- Capacidad antioxidante total por el método ABTS.....	19
5.6.- Determinación de fitoquímicos .....	20
5.6.1.- Extracción.....	20
5.6.2.- Fenoles totales .....	20
5.6.3.- Determinación de taninos hidrolizables .....	21
5.6.4.- Cuantificación de taninos condensados por HCl butanol.....	21
5.6.5.- Determinación de ácido fítico .....	21
5.6.- Contenido mineral .....	22
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
VII.- CONCLUSIONES.....	37
VIII.- BIBLIOGRAFÍA .....	38
VII.- ANEXOS .....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadros</b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Distribución de los tratamientos de FeSO <sub>4</sub> y ZnSO <sub>4</sub> para germinados de <i>Vigna unguiculata</i> .....	18
<b>Cuadro 2.</b> Longitud y rendimiento del germinado biofortificado con sulfato ferroso y sulfato de zinc.....	24
<b>Cuadro 3.</b> Contenido mineral del germinado biofortificado con sulfato ferroso y sulfato de zinc .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Longitud y rendimiento de los germinados de frijol caupí biofortificado con hierro y zinc.....	24
<b>Figura 2.</b> Capacidad antioxidante de los germinados biofortificados de frijol caupí.....	25
<b>Figura 3.</b> Contenido de fenoles totales de los germinados de frijol caupí.....	26
<b>Figura 4.</b> Contenido de taninos condensados de los germinados de frijol caupí.....	27
<b>Figura 5.</b> Contenido de taninos hidrolizables de los germinados de <i>Vigna unguiculata</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Contenido de ácido fítico de los germinados de <i>Vigna unguiculata</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Contenido mineral de los germinados de frijol caupí biofortificados con hierro y zinc.....	32
<b>Figura 8.</b> Contenido de hierro y zinc en los germinados de frijol caupí biofortificados.....	35

## RESUMEN

La germinación es una técnica empleada con éxito en programas de biofortificación. Sin embargo, la semilla que se utiliza para la germinación frecuentemente contiene una cantidad subóptima de microelementos, en especial de hierro (Fe) y zinc (Zn). Por lo que el objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar el efecto de la biofortificación con sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) sobre la capacidad antioxidante, el contenido de fitoquímicos, el contenido mineral y el rendimiento de germinados de frijol caupí. El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x4. El Fe se aplicó como  $\text{FeSO}_4$  (0, 5, 10 y 15  $\text{mM L}^{-1}$ ) y el Zn se aplicó como  $\text{ZnSO}_4$  (0, 5, 10 y 15  $\text{mM L}^{-1}$ ), para un total de 16 tratamientos con tres repeticiones. La adición mayor a 5  $\text{mM L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  limitó el crecimiento y rendimiento del germinado ( $P \leq 0.05$ ), mientras que la adición mayor a 5  $\text{mM L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$  ocasionó la reducción del crecimiento, por otro lado, la adición mayor a 5  $\text{mM L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  presentó mayor capacidad antioxidante. Considerando el conjunto de variables respuestas en los germinados, se concluye que los mejores tratamientos para biofortificar germinados de frijol caupí con  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  fueron T2, T6, T10 y T14.

**Palabras clave:** Antioxidantes; fitoquímicos; germinados; biofortificación.

## ABSTRACT

Germination is a technique successfully used in biofortification programs. However, the seed used for germination often contains a suboptimal amount of microelements, especially iron (Fe) and zinc (Zn). The objective of the present work was to study the effect of biofortification with ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ) on the antioxidant capacity, phytochemical content, mineral content and yield of bean sprouts Cowpea. The experiment was developed under a completely randomized design with 4x4 factorial arrangement. Fe was applied as  $\text{FeSO}_4$  (0, 5, 10 and 15  $\text{mM L}^{-1}$ ) and Zn was applied as  $\text{ZnSO}_4$  (0, 5, 10 and 15  $\text{mM L}^{-1}$ ), for a total of 16 treatments with three replicates. Addition of 5  $\text{mM L}^{-1}$  of  $\text{FeSO}_4$  limited germination growth and yield ( $P \leq 0.05$ ), while addition of 5  $\text{mM L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4$  resulted in reduced growth, on the other hand, higher addition To 5  $\text{mM L}^{-1}$  of  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{ZnSO}_4$  presented higher antioxidant capacity. Considering the set of response variables in the sprouts, it was concluded that the best treatments for biofortifying cowpea sprouts with  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{ZnSO}_4$  were T2, T6, T10 and T14.

**Key words:** Antioxidants; phytochemicals; sprouts; biofortification.

## I.- INTRODUCCIÓN

Se estima más del 30 % de los habitantes en el mundo sufren de deficiencia de Zn (White *et al.*, 2012) y alrededor de 3 mil millones se ven afectados por deficiencia de Fe, particularmente es común en poblaciones que dependen de cultivos básicos como alimento principal y tienen poco o ningún acceso a los productos de origen animal (White y Broadley, 2009).

Los alimentos de origen vegetal, aportan minerales esenciales y fitoquímicos para el organismo; sin embargo, muchos de éstos, poseen propiedades consideradas antinutrientes como los inhibidores de las proteasas, lectinas y ácido fítico (Duranti, 2006). Actualmente existe interés para incrementar el contenido mineral de los alimentos (Zou *et al.*, 2014). En este sentido, se sabe que los germinados pueden prevenir enfermedades cardiovasculares (Benítez *et al.*, 2013; Fernandez-Orozco *et al.*, 2006), al ser consumidos como vegetales frescos (Ren y Sun, 2014), de modo similar poseen antioxidantes, compuestos fenólicos (Fernandez-Orozco *et al.*, 2009; Ghiassi Tarzi *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2014), y un bajo contenido de antinutrientes (Swieca y Gawlik-Dziki, 2015).

Por otro lado, los germinados se consumen en algunas partes de Asia, como alimento tradicional, recientemente, su consumo ha aumentado en Europa occidental y América (Guo *et al.*, 2011). La biofortificación de germinados, es un área de investigación creciente e importante para asegurar una alimentación sana (Moraghan *et al.*, 2006), particularmente en regiones marginadas o donde existe deficiencia de hierro (Fe) y zinc (Zn) en la población, que son actualmente zonas de alta prioridad (Baloch *et al.*, 2014). Sin embargo, existe poca información de trabajos realizados en germinados biofortificados con  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$ , por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antioxidante y el contenido de fitoquímicos de los germinados de *Vigna unguiculata* (L.) Walp biofortificados con  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$ .

## II.- JUSTIFICACIÓN

Hoy en día existe un interés creciente en los germinados, debido a que las semillas, poseen propiedades antinutricionales que no permiten la disponibilidad de los minerales al consumirlos (Duranti 2006). Por ello, es importante considerar otras alternativas de alimentos para disminuir los antinutrientes. En la presente investigación se propone como alternativa el uso de germinados, los cuales presentan cambios cuantitativos y cualitativos en el contenido de compuestos bioactivos y minerales (Świeca y Gawlik-Dziki 2015). Al respecto se sabe que la calidad de los germinados está en función de la metodología empleada para la producción de la semilla y el almacenamiento que se le dé a la misma, por lo que el proceso de producción o las condiciones del proceso de germinación mejora el contenido de compuestos benéficos, y disminuye el contenido de antinutrientes (Świeca y Gawlik-Dziki 2015). Los germinados se consumen a nivel mundial, como alimento tradicional, como vegetales frescos (Rena y Sun 2014) y el germinado de frijol es distinguido por su palatabilidad, ricos en compuestos antioxidantes y contenido mineral (Fernández-Orozco *et al.* 2009).

En la actualidad, se ha incrementado la demanda de alimentos con alto valor nutritivo y ricos en fitoquímicos. Para garantizar estas características en los alimentos, se ha considerado que los germinados pueden cubrir de forma satisfactoria la demanda nutritiva, sin embargo, los germinados por si solos no reúnen la calidad nutricional necesaria (Zielińska-Dawidziak y Siger 2012; Zou *et al.* 2014), por ello es importante la biofortificación para incrementar los minerales y al mismo tiempo contrarrestar los factores antinutricionales. Al respecto, estudios realizados con germinados biofortificados, se encontró un incremento en el contenido micronutrientes (Bouis *et al.* 2011), y mejora la biodisponibilidad de los nutrimentos (Duc *et al.* 2010). Por lo anterior se busca que los germinados biofortificados posean un contenido mayor de minerales, fácilmente aprovechables, por medio de la biofortificación.

### III.- OBJETIVOS

#### 2.1.- Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y fitoquímicos en los germinados biofortificados de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

#### 2.2.- Objetivos específicos

1. Evaluar el rendimiento y crecimiento de los germinados de frijol caupí biofortificados con diferentes dosis de sulfato ferroso y sulfato de zinc.
2. Determinar la capacidad antioxidante y los fitoquímicos en los germinados biofortificados con sulfato ferroso y sulfato de zinc.
3. Incrementar el contenido de hierro y zinc en los germinados de *Vigna unguiculata*.

#### 2.3.- Hipótesis

La adición de sulfato ferroso y sulfato de zinc afecta la capacidad antioxidante, el contenido de fitoquímicos y el contenido mineral en los germinados de *Vigna unguiculata*.

## IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1.- Generalidades de las leguminosas

Las leguminosas (Fabáceas) son alimentos básicos para millones de personas, en la actualidad, están adquiriendo una función todavía más importante como cultivos comerciales. La importancia de las leguminosas se deriva por su gran valor nutricional a la dieta (FAO, 2016), son la segunda familia de mayor importancia de cultivos después de las gramíneas (Poáceas), representan el 27 % de la producción agrícola mundial, y proporcionan 33 % de la proteína en la dieta de los seres humanos (Smýkal *et al.*, 2014).

La familia tiene 800 géneros y 20,000 especies distribuidas en todo el mundo (Lewis, 2005), entre las leguminosas domesticadas más antiguas, se encuentran la soya (*Glycine max* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medik), chícharo (*Pisum sativum* L.), la haba (*Vicia faba*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Smýkal *et al.*, 2014), que en compañía de la producción de cereales formaron parte de la dieta de las primeras civilizaciones de Medio Oriente y el Mediterráneo (López *et al.*, 2013). Los alimentos derivados de las especies de ésta familia son ricos en proteína, carbohidratos, fibra dietética, vitaminas del complejo B (López-Amorós *et al.*, 2006), macroelementos (De Vega y Sangronis, 2006), microelementos (Díaz *et al.*, 2010), y fitoquímicos (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013). En México, el frijol es uno de los cultivos de mayor importancia, representa un medio importante de ingresos para los productores y en el sector agroalimentario son las fuentes principales de nutrimentos, principalmente las del sector rural (Rodríguez-Licea *et al.*, 2010).

### 4.2.- Producción nacional de frijol

El frijol es un producto de gran importancia en la dieta nacional. Participa con el 2 % del valor de la producción agrícola y concentra 1.6 millones de hectáreas (SIAP, 2013). Existen más de 70 variedades, entre negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. En el año 2012, la producción de frijol alcanzó 1.1 millones de toneladas, en el año 2013, 1.3 millones de toneladas,

para el año 2014, 1.2 millones de toneladas y para el año 2015 hubo una producción de 0.96 millones de toneladas, con rendimiento promedio de 620 kg ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2016). Dentro de todas las variedades, se encuentra el frijol caupí (*V. unguiculata*).

#### **4.3.- Cultivo del frijol caupí**

El frijol caupí es una de las 159 especies del género *Vigna* que se encuentran distribuidas en todo el mundo, se agrupan en los subgéneros, *Vigna*, *Ceratotropis*, *Plectotropis*, *Sigmoidotropis*, *Lasiosporon*, y *Haidonia* (Vijaykumar *et al.*, 2010). El subgénero *Vigna* comprende 40 especies, entre las de mayor importancia agrícola se encuentra *V. unguiculata* (caupí o frijol pelón), *V. mungo*, *V. radiata*, y *V. subterránea* (Vijaykumar *et al.*, 2010). El frijol caupí es una leguminosa tropical-subtropical que ha sido cultivada desde la antigüedad por los pequeños y medianos productores (Avanza *et al.*, 2012), fue domesticado en la región del Sahel de África occidental (Smýkal *et al.*, 2014), se introdujo en Europa a partir de su centro de distribución en África y en la actualidad se cultiva en la región mediterránea (Bejarano *et al.*, 2014). Se siembra principalmente para su consumo como grano seco y verdura, (Apáez-Barrios *et al.*, 2013) en tres continentes (África, América y Europa). Dentro de las leguminosas, se encuentra entre los primeros cinco lugares en producción mundial por su alto contenido de proteína, de 23 a 25 % y 50 a 67 % de carbohidratos (Devi *et al.*, 2015), y 4 % de fibra (Iqbal *et al.*, 2006). Considerando las características mencionadas anteriormente el frijol caupí puede ser un componente importante en la dieta humana, sin embargo posee algunas propiedades indeseables que son comunes en otras semillas de leguminosas, considerados como factores anti nutricionales tales como; inhibidores de las proteasa, lectinas, ácido fítico, entre otros (Giami, 2005).

La superficie mundial cosechada en el año 2013 fue de 12, 517, 583 hectáreas con rendimiento promedio de 446.5 kg ha<sup>-1</sup> (FAO, 2014), mientras que en México, en el año 2014 se obtuvo una producción de 1, 173.78 toneladas, con una superficie de 337.54 hectáreas cosechadas, procedente de los estados de

la región sureste del país (SIAP 2016). En Tabasco, los municipios de Comalcalco, Cunduacán y Cárdenas son los que más producen frijol caupí, que junto con el frijol común, es la principal fuente de proteína de origen vegetal entre la población rural (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2008). Así mismo en comparación con otras leguminosas, éste puede ser considerado como un alimento funcional, debido a su contenido de fenoles relacionados con una actividad antioxidante importante (Carunchia *et al.* 2015).

#### **4.4.- Antioxidantes**

Los radicales libres de oxígeno causan daño oxidativo y se asocian con diferentes tipos de enfermedades cardiovasculares, diabetes y desórdenes del sistema nervioso (Cabrera y Serrano, 2014; Dixit *et al.*, 2005; Tekale *et al.*, 2016). El consumo de antioxidantes contrarresta los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), por ello, Choe y Min (2005) indicaron que los compuestos antioxidantes retrasan o previenen de forma significativa la oxidación.

En este sentido, existen antioxidantes naturales y sintéticos, sin embargo, este último, en niveles de alta dosis de aplicación pueden ser cancerígenos, mientras que, los antioxidantes naturales son capaces de neutralizar las ERO y prevenir ciertas enfermedades (Jiang y Xiong, 2016).

Así mismo existen grupos de compuestos antioxidantes, como los enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasas y catalasa) (Hadley *et al.*, 2002), hierro y vitaminas (vitamina C, vitamina E, y  $\beta$ -caroteno) (Benítez-Zequeira, 2006), polifenoles, flavonoides, y algunos pigmentos como, los carotenoides y las antocianinas (Jiménez-Zamora *et al.*, 2016). Muchos de los compuestos antioxidantes en la ingesta del ser humano se derivan a partir de frutas, verduras y legumbres en la dieta (Figuroa-Cares *et al.*, 2010). Así como los antioxidantes, existen otras sustancias como los fitoquímicos que son benéficos para el hombre y se encuentran en alimentos de origen vegetal.

## **4.5.- Fitoquímicos**

Los fitoquímicos son sustancias naturales benéficas pero no nutritivas, se producen de forma natural, y son biológicamente compuestos activos que se encuentran en el reino vegetal (Chang *et al.*, 2016). Los alimentos con alto contenido de fitoquímicos son considerados alimentos funcionales y este término es definido por Hasler (2002) como todos aquellos alimentos integrales, fortificados, enriquecidos o mejorados que proveen beneficios para la salud más allá de la provisión de nutrientes esenciales.

Se sabe que al consumir alimentos funcionales, con alto contenido de compuestos antioxidantes y fitoquímicos se relaciona con el incremento de estos compuestos en el cuerpo humano (Benavides-Mendoza, 2002). En este caso, los alimentos funcionales, se han convertido en una oportunidad para cuidar la salud de la población que buscan seguridad y bienestar alimentaria, para eso el análisis de los fitoquímicos es muy importante debido a que suelen estar relacionadas con sus actividades biológicas (Zhao *et al.*, 2016).

Por lo anterior, los germinados son considerados alimentos funcionales que proporcionan aminoácidos, fibra dietética, oligoelementos, vitaminas y compuestos fenólicos (Lee *et al.*, 2013), ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica, cáncer, diabetes (Acosta-Estrada *et al.*, 2014). Por otro lado, en las verduras y hortalizas, las condiciones agronómicas, cosecha, poscosecha y elaboración de los alimentos, influyen de manera significativa en los niveles de fitoquímicos (Tiwari y Cummins, 2013; Williams *et al.*, 2013), por lo anterior, es importante el estudio y manejo de los factores como el tiempo, temperatura, la humedad relativa durante el proceso de germinación, ya que son importantes para determinar la calidad del germinado (Dávila *et al.*, 2003).

### **4.5.1.- Fenoles totales**

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidroxilo, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Choe y Min, 2009). Son los metabolitos secundarios más abundantes

en las plantas, en el año 2010 se conocían más de 8000 estructuras fenólicas (Dai y Mumper 2010), algunos indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismo de defensa bajo situaciones de estrés (Kim *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que existe una relación entre los fenoles y la actividad antioxidante (Chon, 2013), debido a la capacidad de captura que tienen los radicales libres (Restrepo, 2015); por lo tanto, son considerados como un grupo de antioxidantes naturales, que principalmente se encuentran en frutas, verduras, y cereales (Tekale *et al.*, 2016), además, tienen propiedades anticancerígenos, antitumoral (Peñarrieta *et al.*, 2014), antivirales (Lamien *et al.* 2005), entre otros. Los fenoles comprenden un promedio de 24 % de los fenoles totales presentes en los alimentos (Adom y Liu, 2002).

#### **4.5.2.- Taninos**

Los taninos son un grupo único de metabolitos fenólicos que se distribuyen ampliamente en casi todos los alimentos vegetales, contienen principalmente grupos que forman complejos fuertes con proteínas y otras macromoléculas bajo condiciones particulares (Isaza, 2007); son conocidos por su capacidad para unirse a otras macromoléculas como los carbohidratos, proteínas, mediante fuerzas covalentes y no covalentes y por su astringencia y sabor amargo (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014).

Los taninos se dividen en dos grupos, de acuerdo a su estructura química y sus propiedades, taninos condensados e hidrolizables (Hassanpour *et al.*, 2011).

1. Los taninos condensados ofrecen propiedades físicas y químicas heterogéneas, los cuales se traducen en diversas actividades biológicas como, antioxidantes, quimioterapéuticas, antiinflamatorias, antitumoral y antimicrobianas (Jin *et al.*, 2013). Sin embargo, en nutrición son importantes debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilos y conducen a la formación de complejos con proteínas, iones metálicos y esto influye en la absorción dietética de los nutrientes (Caldas y Blair, 2009).

2. Los taninos hidrolizables, por lo general, se encuentran en concentraciones más bajas que los condensados, son más susceptibles a hidrólisis en condición fisiológica, permitiendo la liberación gradual de sus componentes (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014), son ésteres de ácido gálico de alcoholes poliatómicos que forman carbohidratos y ácidos fenolcarbónicos bajo la acción de ácidos y bases (Borisova 2015). Los taninos hidrolizables, tienen efectos positivos en la eliminación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, además, exhiben una variedad de propiedades como antiinflamatorias, antialérgicas, efecto antidiabético, actividad anticancerígena, propiedades antimicrobianas y antivirales (Lee *et al.*, 2010).

#### **4.6.- Factores antinutricionales**

##### **4.6.1.- Ácido fítico**

El ácido fítico y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo en granos de cereales y leguminosas (Martínez-Domínguez *et al.*, 2002), aunque, en esta forma el ser humano no lo puede aprovechar, debido a que el organismo por sí solo no puede producir la enzima (fitasa) para hidrolizar el ácido fítico y liberar así el fósforo de este compuesto (Sotelo *et al.*, 2002). En las plantas, es un compuesto con actividad antinutricional, debido a su alta capacidad de formar complejos insolubles con proteínas y minerales hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (Liang *et al.*, 2008), se encuentra comúnmente en cultivos de cereales y leguminosas y tiene un impacto negativo principalmente en hierro y biodisponibilidad de zinc en las dietas basadas en vegetales (Nair *et al.*, 2015).

Una alta concentración de ácido fítico en los alimentos causa un problema principalmente a los vegetarianos, porque el contenido de algunos minerales como el Fe y el Zn son similares, por lo tanto, la biodisponibilidad de estos minerales puede estar comprometida (Febles *et al.*, 2000). Se sabe que el consumo diario de fítato para los seres humanos con dietas vegetarianas, en

promedio, es de 2000 a 2600 mg mientras que los habitantes de zonas rurales con dietas mixtas de países en desarrollo, es de 150 a 1400 mg (Reddy, 2002). Sin embargo, el consumo de alimentos con ácido fítico también presenta efectos positivos sobre la salud, como anticancerígeno, reducción de la formación de cálculos renales, prevención de enfermedades cardiovasculares (Kumar *et al.* 2010) y actividad antioxidante (Graf y Eaton, 1990). El ácido fítico es un quelante activo de iones metálicos divalentes en semillas de plantas, la mayoría de los cuales se puede disminuir a largo plazo por diferentes técnicas como el remojo, la cocción, el descascarillado, la fermentación, el almacenamiento, la radiación y la germinación (Kumar *et al.* 2010; Wang *et al.*, 2016).

#### **4.7.- Germinación**

La germinación es un proceso natural en el cual la semilla pasa de un estado de latencia a un estado de actividad, comienza con la absorción de agua y termina en el momento que sale la radícula, la reserva de carbohidratos se degradan, para ser utilizados en la respiración y la síntesis de nuevas células antes de desarrollar el embrión (Vidal-Valverde *et al.*, 2002), se reactiva el metabolismo para dar paso a la hidrólisis de proteínas, síntesis de los carbohidratos, y acumulación de metabolitos (Caceres *et al.*, 2014).

Actualmente, los germinados están ganando popularidad en los países occidentales, una amplia variedad de brotes frescos se venden como nuevo alimento saludable, debido a que son altamente nutritivos (Bains *et al.*, 2014), y por su biodisponibilidad de minerales (Guo *et al.*, 2011). La importancia de los germinados no solo se debe a los minerales, incluso, diversos compuestos antioxidantes (Kestwal *et al.*, 2012; Pajak *et al.*, 2014), compuestos fenólicos (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2010; Ren y Sun, 2014), y antinutrientes en menor proporción (Kumari *et al.*, 2014). En este sentido, Kaushik *et al.* (2010), encontraron que la germinación mejoró el contenido de calcio (Ca), cobre (Cu), manganeso (Mn), Zn, y contenido de vitamina C.

De modo similar Sangronis y Machado (2007), evaluaron el efecto de la germinación en factores antinutricionales de frijoles y encontraron que la reducción del ácido fítico fue de más de 40 % para el germinado. La acumulación de compuestos bioactivos durante la germinación puede variar dependiendo del cultivar, la presencia de aditivos y aireación de la temperatura de la solución de remojo y tiempo durante la fase de absorción de agua, y los días de germinación (Watchararparpaiboon *et al.*, 2010).

#### **4.8.- Biofortificación**

En la actualidad, se estima que más del 60 % de la población mundial sufre de deficiencia de hierro, más del 30 % de zinc, 30 % de yodo (I) y aproximadamente 15 % de selenio (Se) (White *et al.*, 2012), por lo tanto existen técnicas como la biofortificación para poder revertir esa problemática. La biofortificación es definida por Dwivedi *et al.* (2012) como el proceso de aumento de las concentraciones biodisponibles de un elemento en las partes comestibles de las plantas mediante la intervención agronómica o selección genética. El objetivo principal de los programas de fortificación de alimentos es para incrementar el contenido de minerales en la dieta, además de prevenir y controlar deficiencia en la población humana.

Los resultados del incremento al contenido de micronutrientes de los cultivos básicos a través de biofortificación son especialmente prometedores, y se han realizado trabajos principalmente en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Blair, 2013), frijol caupí (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015), maíz (*Zea mays* L.) (Pachon *et al.*, 2009; Subbaiah *et al.*, 2016), arroz (*Oryza sativa* L.) (Bashir *et al.*, 2013), en hortalizas como la cebolla (*Allium cepa* L.) (Almendros *et al.*, 2015), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Lagerkvist *et al.*, 2016), chícharo (*Pisum sativum* L.) (Poblaciones y Rengel, 2016).

##### **4.8.1.- Técnicas de biofortificación**

Existen diferentes técnicas para la biofortificación, como la ingeniería genética, por ejemplo se han desarrollado productos modificados como el arroz dorado que ha sido manipulado para producir beta-caroteno, al realizar una

modificación del ADN utilizando información de la planta *Narcissus pseudonarcissus* (Ye *et al.*, 2000) o papas genéticamente modificadas para alterar su composición nutricional (Prescha *et al.*, 2003).

Otro método aplicado en la fortificación de alimentos es durante el manejo agronómico del cultivo, con el fin de generar cambios en la composición de los alimentos de origen vegetal, aplicando micronutrientes, como Fe, Zn, Se, I, que ha permitido desarrollar productos como frijol caupí biofortificadas con hierro (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015), al igual que cebollas fortificadas con zinc (Almendros *et al.*, 2015), lechuga con yodo (Smoleń *et al.*, 2014), chícharo fortificado con zinc (Poblaciones y Rengel, 2016), trabajos enfocados a las necesidades nutricionales de la población.

#### **4.9.- Importancia del zinc en plantas**

El zinc (Zn) es esencial en la nutrición de las plantas. Es el segundo metal de transición más abundante en organismos después del Fe, y el único metal representado en seis clases de enzimas (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas (Broadley *et al.*, 2007), en la que se contribuye a la producción de energía, la síntesis de proteínas y la regulación del crecimiento (Almendros *et al.*, 2015).

La concentración y absorción de Zn se utiliza como indicador del estado nutricional de la planta (Hafeez *et al.*, 2013; Mohammadi y Khoshgoftarmanesh, 2014). Asimismo, se pueden utilizar otros parámetros para estimar la calidad de las plantas, como Zn soluble en agua, en ácidos o quelatos diluidos (Álvarez, 2010), y el contenido de clorofila (Baglieri *et al.*, 2014).

Sin embargo, el Zn procedente de los alimentos vegetales es de menor biodisponibilidad debido a la presencia de antinutrientes como el ácido fítico (Rubio *et al.*, 2007), y como resultado de la no biodisponibilidad, numerosas funciones de las plantas son afectadas (Cakmak y Kirkby, 2008), entre ellas, causa la deficiencia de perturbaciones importantes en el crecimiento y el desarrollo, debido a la gran diversidad de funciones celulares y las vías metabólicas directamente influenciadas (Pascual *et al.*, 2016).

Para mejorar las concentraciones y biodisponibilidad de zinc en tejidos comestibles, existen estrategias agronómicas que generalmente se basan en la aplicación de fertilizantes minerales, optimización en la solubilidad y movilización de elementos en el suelo (Blair, 2013).

#### **4.10.- Zinc en humanos**

El Zn es un elemento esencial para el organismo humano, se distribuye en todos los órganos, tejidos, fluidos y secreciones (Torres-Domínguez, 2009), el 83 % del zinc en el cuerpo está en músculo y hueso, en cantidades bajas en la piel, el hígado, los riñones, el cerebro, el tracto gastrointestinal y la próstata (López de Romaña *et al.*, 2010).

Este elemento es un cofactor catalítico de más de 80 enzimas conocidas y participa en mecanismos que permiten el transporte del dióxido de carbono, en los glóbulos rojos, desde los tejidos hasta los pulmones; además de contribuir a mantener la eficacia del sistema inmunológico y la replicación de los genes (Schoolchildren, 2010).

Por otra parte, es un elemento que presenta problemas de deficiencia en el hombre, se estima que más del 30 % de los 6 mil millones de habitantes en el mundo sufren de deficiencia de Zn (White *et al.*, 2012). Por otra parte, en México la deficiencia de microelementos también es un problema de salud; en niños menores de once años, se representa el 28 % de deficiencia (Rivera-Dommarco, 2012).

Se ha considerado que la deficiencia de Zn ocupa el quinto lugar entre los factores de riesgo importantes asociado con la enfermedad y la muerte, en particular con los países en desarrollo, especialmente niños lactantes y menores de cinco años (Das y Green, 2013), las diferentes tipos de enfermedades que se presentan son las alteraciones en desarrollo físico, el sistema inmunológico, la capacidad de aprendizaje, y aumenta el riesgo de infección, el daño del ADN, y el cáncer (Cakmak *et al.*, 2010; Prom-u-thai *et al.*, 2012).

La deficiencia de Zn se debe al bajo contenido de este elemento en los alimentos que provienen de los cultivos (Hotz y Brown, 2004), y un método rápido y eficaz de abordar la carencia de Zn en los suelos, cultivos y seres humanos es aplicar fertilizantes de Zn durante la producción de los cultivos (Das y Green, 2013). El cuerpo humano, contiene aproximadamente de 1.5 a 2.5 g de Zn (Torres-Domínguez, 2009) y la ingesta diaria recomendada en la dieta es de 10 a 15 mg (Wei *et al.*, 2012).

#### **4.11.- Hierro en las plantas**

Es un micronutriente esencial, constituyente de macromoléculas importantes para la respiración, la fotosíntesis, la síntesis de ADN, y el metabolismo (Briat *et al.*, 2010).

El hierro (Fe) junto con el cobre (Cu) sirven como cofactores críticos por los componentes de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y en el cloroplasto, además, actúa como aceptor y dador de electrones en una serie de procesos celulares clave, incluyendo la fotosíntesis, la respiración, asimilación del sulfato y la biosíntesis de etileno (Palmer y Guerinot, 2009), aunque el Fe es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, es poco biodisponible en el suelo, ya que se une rápidamente a las partículas del suelo y forma complejos insolubles en condiciones aeróbicas a un pH neutro o alcalino (Gomez-Galera *et al.*, 2010).

#### **4.12.- Funciones del hierro en el hombre**

Las deficiencias de micronutrientes esenciales son responsables de la llamada "desnutrición oculta". En la actualidad la deficiencia de Fe es común en la nutrición humana. Se estima que alrededor de 3 mil millones de habitantes en el mundo son afectados por esta deficiencia, particularmente en poblaciones que dependen de cultivos básicos como alimento principal y tienen poco o ningún acceso a los productos de origen animal (White y Broadley, 2009), mientras que en México se reporta un 26 %, principalmente en niños menores de 11 años (Rivera-Dommarco, 2012), por lo que la deficiencia interfiere en su crecimiento y desarrollo.

El contenido total de hierro de una persona es aproximadamente de 3.5 a 4 g en la mujer y de 4 a 5 g en el hombre (Forrellat-Barrios *et al.*, 2000), con requerimientos de 8 a 18 mg día<sup>-1</sup> (White y Broadley, 2005), esta cantidad de Fe se utiliza para producir hemoglobina, además es un importante componente de muchas enzimas que son esenciales para el funcionamiento adecuado de las células cerebrales, musculares y del sistema inmunológico (Schoolchildren, 2010).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, ubicada en el municipio de Centro, Tabasco, México; en las coordenadas 17° 46' 56" N y 92° 57' 28" O, a una altitud de 21 m sobre el nivel del mar, con promedio de 37 °C. (CONAGUA, 2016).

### 5.2.- Obtención de semilla

Se utilizaron semillas de frijol caupí cv de "Castilla". La siembra se realizó el 4 de julio de 2015, en bolsas de polietileno negro, de 30 cm de ancho por 35 cm alto, llenadas con tepetzil (sustrato inerte). Durante el ciclo del cultivo se aplicó la solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950).

Para suministrar los microelementos en la solución nutritiva se utilizó el producto TradeCorp AZ®. El pH de la solución se ajustó entre 5.5 y 6.0 con ácido sulfúrico. Se aplicó 0.5 L por maceta de solución nutritiva a partir de los tres días después de la siembra (ds) hasta los 20 ds (Márquez-Quiroz *et al.* 2015).

Los primeros 20 dds, las plántulas recibirán una solución nutritiva al 50 % de concentración de la solución de Hoagland y Arnon. En tanto que a partir de los 21 ds y hasta el final del ciclo, se aplicó 1 L por maceta de la solución nutritiva al 100 % de concentración, además cada ocho días se adicionó 2 L de agua para lavar las sales del sustrato.

### 5.3.- Producción de germinados

La obtención de los germinados se realizó por triplicado, de acuerdo con la metodología descrita por Fernandez-Orozco *et al.* (2008). Se desinfectó 75 g de semillas de frijol caupí, por tratamiento, con una solución acuosa al 0.07 % de hipoclorito de sodio, posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada. Subsecuentemente, las semillas se sumergieron en 180 mL de agua

destilada con el tratamiento correspondiente durante 6 h, al finalizar el periodo de imbibición se colocó en tres partes iguales en charolas de plástico de 15 X 15 cm con papel filtro humedecido.

Las charolas se colocaron en el interior de la cámara de crecimiento, Lumistell® ICP-09, a 25 °C y 70 % de humedad relativa por seis días. El riego se aplicó cada 24 h de la siguiente manera: en el primer y segundo día después de la siembra (ds), se adicionó 20 mL de agua destilada a cada charola, y a partir del tercer día y hasta el sexto día ds se aplicó 20 mL del tratamiento correspondiente.

El Fe se aplicó como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , grado reactivo; 0, 5, 10 y 15  $\text{mM L}^{-1}$ ), y el Zn se aplicó como sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , grado reactivo; 0, 5, 10 y 15  $\text{mM L}^{-1}$ ), es decir un total de 16 tratamientos (Cuadro 1) con tres repeticiones, bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x4. Los factores fueron las dosis de  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$  empleadas para biofortificar el germinado. Después de los seis ds, los germinados se lavaron con agua destilada, y para medir el rendimiento se procedió a pesar el germinado en fresco, y para la elongación del hipocótilo se utilizaron 30 germinados como grupo de muestreo, posteriormente se secaron a una temperatura de 55 °C hasta obtener peso constante (22 h), a continuación los germinados se trituraron y la harina fue guardada en bolsas de plástico y almacenadas a 4 °C, para su análisis.

#### **5.4.- Análisis estadístico y diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 4x4, con tres repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y comparación de medias, con la prueba de Duncan a un  $\alpha=0.05$ . Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS versión 9.4 para Windows.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$Y_{jk} = \mu + A_j + B_k + AB_{jk} + E_{jk}$ , donde:

$j$  = factor A

$k$  = factor B

$Y_{jk}$  = observación del factor j en el factor k.

$\mu$  = efecto de la media general

$A_j$  = efecto del j-esimo factor A

$B_k$  = efecto del k-esimo factor B

$AB_{jk}$  = efecto de la interacción del factor A Y B

$E_{jk}$  = el error experimental.

**Cuadro 1.** Distribución de los tratamientos de  $FeSO_4$  y  $ZnSO_4$  para germinados de *Vigna unguiculata*.

Tratamientos	Dosis de $FeSO_4$ (mM L <sup>-1</sup> )	Dosis de $ZnSO_4$ (mM L <sup>-1</sup> )
T1(Testigo)	0	0
T2	0	5
T3	0	10
T4	0	15
T5	5	0
T6	5	5
T7	5	10
T8	5	15
T9	10	0
T10	10	5
T11	10	10
T12	10	15
T13	15	0
T14	15	5
T15	15	10
T16	15	15

### 5.5.- Capacidad antioxidante total por el método ABTS

Se determinó por el método espectrofotométrico del radical libre ABTS [catión radical 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)], descrito por Ramírez *et al.* (2010). Se pesaron 100 mg de muestra en tubos eppendorf de 2 mL, se adicionó 1.5 mL de solución buffer a pH 7.2, se agitó en el vortex por 30 segundos posteriormente se colocó en el ultrasonificador por 5 minutos, pasado el tiempo correspondiente fue puesto en la centrifuga marca PRISMR durante 10 minutos a 11000 rpm a 4 °C, después se recogió el sobrenadante y se colocó en otro tubo eppendorf para la determinación de capacidad antioxidante total empleando el kit "total antioxidant status kit assay" de Calbiochem® que consta de una solución amortiguadora (fosfato salino), cromógeno (Metmioglobina y ABTS ® [catión radical 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)], sustrato estabilizado (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y como estándar el análogo de la vitamina E, Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametil croman-2-carboxílico) 1.5 mM (Miller *et al.*,1993). Se prepararon los tres reactivos incluidos en el kit de la siguiente forma: Al cromógeno y al sustrato se le agregaron 10 y 1.5 mL de amortiguador (pH7) respectivamente, al estándar se le agregó 1 mL de agua grado HPLC.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estabilizado y el cromógeno se equilibraron a 37 °C, exactamente cinco minutos antes de ser utilizados. La absorbancia fue determinada usando un lector de microplaca marca BIOTEK ELx808 a 630 nm. El blanco se preparó agregando 5 µL de agua grado HPLC en una celda y 250 µL de cromógeno. En otra celda se preparó el estándar, agregando 5 µL de Trolox y 250 µL de cromógeno, y se leyó la absorbancia inicial (A<sub>0</sub>) en ambos.

Los extractos de germinados se analizaron al colocar 5 µL de extracto centrifugado y 250 µL de cromógeno, se mezclaron y se leyó la absorbancia inicial, se añadieron 50 µL del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estabilizado diluido, se mezclaron y se tomó el tiempo de inicio simultáneamente. La absorbancia final (A) se midió después de tres minutos del desarrollo de color. La temperatura se mantuvo a 36°C

durante toda la prueba. La capacidad antioxidante en las muestras se calculó utilizando una curva de calibración con una  $R^2=0.9934$ , con el estándar Trolox (anexo 1). Los resultados se expresaron como mM de equivalentes de Trolox por mg de peso seco de la muestra.

## **5.6.- Determinación de fitoquímicos**

### **5.6.1.- Extracción**

La determinación de fenoles totales se realizó mediante la técnica descrita por Sultana *et al.* (2009). En tubos eppendorf se pesó 100 mg de muestra, se le agregó 5 mL de acetona: agua (50:50), y se agitó en el vortex por 10 segundos, posteriormente se sonicó por cinco minutos y luego se colocaron en un agitador rotatorio durante dos horas y luego se pasó a la centrifuga a 10000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se separó con una micropipeta y se colocó en nuevos tubos eppendorf.

### **5.6.2.- Fenoles totales**

Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como solución madre a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>, se aforó con una solución de agua- acetona 50:50. Los estándares se prepararon en matraces de 25 mL a una concentración de 7.5, 15, 30, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup>, se aforó con agua: acetona (anexo 2).

El contenido de fenoles se determinó colorimétricamente utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu. Para la reacción se colocó 50 µL del extracto, 200 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1M, 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %, 5 mL de agua destilada, antes de la lectura de las muestras se incubaron y se dejó reposar por dos horas, después de este tiempo se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS marca GENESYS™ 10S. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g<sup>-1</sup>).

### **5.6.3.- Determinación de taninos hidrolizables**

La cuantificación se realizó siguiendo la metodología descrita por Makkar (1993), se colocó 800  $\mu$ L de la muestra, luego se agregó 800  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcló, dejándolos reaccionar por cinco minutos, después de este tiempo, se adicionó 800  $\mu$ L de carbonato de sodio (0.01 M) y se mezcló dejándolo reposar de nuevo por cinco minutos. Finalmente, se diluyó la solución con 5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 790 nm en el espectrofotómetro UV-VIS marca GENESYS™ 10S.

Para calcular la concentración de taninos hidrolizables en la muestra, se realizó una curva patrón utilizando 5, 10, 15, 25, 50 y 100 mg de ácido tánico como estándar (anexo 3).

### **5.6.4.- Cuantificación de taninos condensados por HCl butanol**

Para la determinación de taninos condensados, se utilizó la metodología descrita por Terrill (1992), en tubos de ensaye se colocaron 0.5 mL de la muestra o el estándar, sobre este se agregaron tres mL de ácido clorhídrico (HCl):Butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol. Todos los tubos fueron calentados por 1 h en un baño maría a 100 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS marca GENESYS™ 10S a 460 nm. La cantidad de catequina en las muestras fue calculada por medio de la ecuación resultante de las lecturas de la curva patrón con catequina, utilizando concentraciones de 50, 100, 250 y 500 mg (anexo 4).

### **5.6.5.- Determinación de ácido fítico**

El ácido fítico se determinó por el método descrito por Haug y Lantzsch (1983), en la que el ácido se precipita con una solución de hierro. La técnica de extracción consistió en pesar 0.5 g de muestra, se agregó 10 mL de HCl a 0.3 M, se agitó por 30 segundos en un vortex (marca GENIE 1 MODELO TOUCH MIXER), luego se colocó en un sonicador por 5 minutos, posteriormente se dejó

reposar 1 h a temperatura ambiente, luego se volvió a sónica por cinco minutos y se dejó reposar una hora más, posteriormente se centrifugó (HERMLE labnet Z206A) a 6000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

Después, a 2 mL de cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_2$ ) al 2 % se agregó 2.5 mL de sobrenadante, se agitó con el vortex por 30 segundos, y luego se puso a calentar en un baño maría a 120 °C por 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante y se agregó 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH). Después a temperatura ambiente, se agregó 2 mL de 2-bipiridina.

La absorbancia se midió inmediatamente a 600 nm en el espectrofotómetro UV-VIS marca GENESYS™ 10S. La curva de calibración de fátato fósforo se realizó con fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Primero se preparó una solución patrón de 50 ppm y se hicieron diluciones para 0.05, 0.1, 0.5 y 1 ppm (anexo 5). El resultado se expresó en mg de ácido fítico por gramo de muestra ( $\text{mg AF g}^{-1}$  de muestra).

## 5.6.- Contenido mineral

El contenido de nitrógeno (N) se determinó con el método Dumas (1831), el fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), hierro (Fe) y zinc (Zn) se determinó por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES ICAP® 7200 Duo, Thermo Fisher Scientific), previa digestión húmeda.

## VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La medición de la elongación del hipocótilo es una variable importante, porque se relaciona con el rendimiento. En las interacciones, los tratamientos T6 y T2, presentaron disminución de 57 y 58 % respectivamente en comparación con el testigo (cuadro 2). Por otra parte, el aumento de la concentración de Fe y Zn afecta negativamente la elongación del hipocótilo, en este sentido, se presentó una disminución entre 38 a 56 %, y de 17 y 40 % en aplicaciones de Fe y Zn, respectivamente (figura 1A).

El peso fresco se incrementó 26.5 % con la aplicación de 15 mM L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> en comparación con el testigo, mientras que, en los tratamientos con FeSO<sub>4</sub> disminuyó 28 % (figura 1B). Por otro lado, el tratamiento T4 tuvo un incremento de 18.9 %, mientras que el resto de los tratamientos tuvieron una disminución respecto al testigo.

En cuanto al efecto en el decremento de la longitud del germinado, estos resultados se asemejan a los reportados por Wei *et al.*, (2013), quienes mencionan que al aplicar más de 0.25 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> se inhibió el crecimiento de los germinados de arroz, mientras que Zielińska-Dawidziak y Siger (2012), mencionan que el crecimiento de los germinados es inhibido a partir de la aplicación de 20 mM L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, sin embargo, el crecimiento no se detuvo. Por otra parte Zou *et al.*, (2014) reportan un aumento de 19 % de peso fresco en germinados de soya biofortificados con ZnSO<sub>4</sub>, mientras que Przybysz *et al.* (2016) reportan un decremento de 13, 16.1, 32.3 y 68.7% en el peso fresco de los germinados de frijol mungo, alfalfa, rábano y brócoli respectivamente, en comparación con el testigo, al adicionar 36 mg L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> durante la germinación.

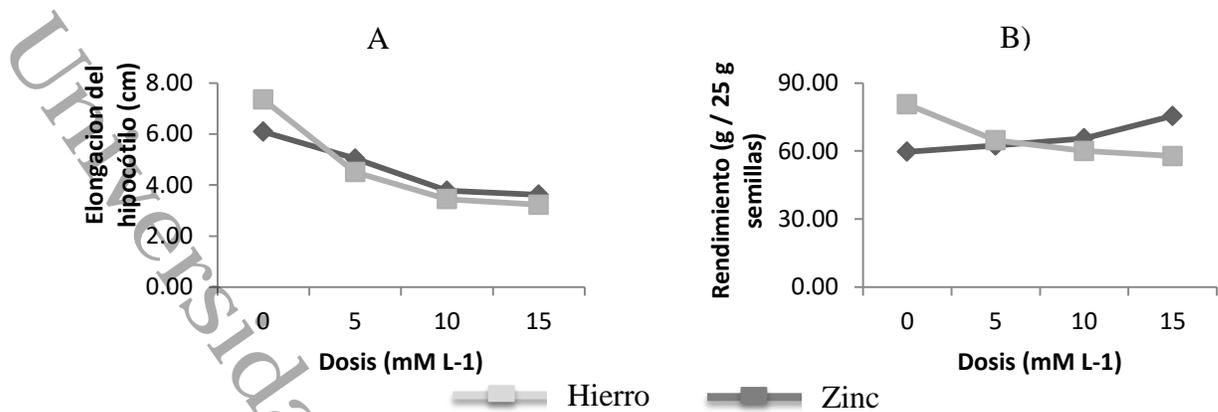
El bajo crecimiento de los germinados del presente estudio se debe al estrés que se genera por las altas concentraciones de sales, al respecto Hussein *et al.* (2007), indican que existe una relación negativa entre el crecimiento vegetativo y el aumento de sales en un cultivo, de modo similar Nagajyoti *et al.* (2010), mencionan que los altos niveles de Zn causan toxicidad y provocan la

disminución en el crecimiento y el desarrollo en diversas especies de plantas, entre las que se encuentra el frijol y de acuerdo con Lindh (2013) las dosis extremadamente altas de elementos tóxicos pueden conducir a la muerte de la planta.

**Cuadro 2.** Longitud y rendimiento del germinado biofortificado con sulfato ferroso y sulfato de zinc.

Tratamiento	Longitud del germinado (cm)	Rendimiento (g)
T1	14.91 <sup>a</sup>	80.6 <sup>ab</sup>
T2	6.21 <sup>b</sup>	69.7 <sup>bc</sup>
T3	4.53 <sup>bcd</sup>	76.1 <sup>abc</sup>
T4	3.74 <sup>cd</sup>	95.9 <sup>a</sup>
T5	3.75 <sup>cd</sup>	53.1 <sup>c</sup>
T6	6.35 <sup>b</sup>	66.0 <sup>bc</sup>
T7	4.71 <sup>bc</sup>	72.1 <sup>bc</sup>
T8	3.23 <sup>cd</sup>	67.8 <sup>bc</sup>
T9	2.81 <sup>cd</sup>	51.3 <sup>c</sup>
T10	4.24 <sup>bcd</sup>	61.9 <sup>bc</sup>
T11	3.52 <sup>cd</sup>	60.6 <sup>bc</sup>
T12	3.26 <sup>cd</sup>	66.3 <sup>bc</sup>
T13	2.91 <sup>cd</sup>	53.6 <sup>c</sup>
T14	3.37 <sup>cd</sup>	52.3 <sup>c</sup>
T15	2.36 <sup>d</sup>	53.5 <sup>c</sup>
T16	4.28 <sup>bcd</sup>	71.9 <sup>bc</sup>

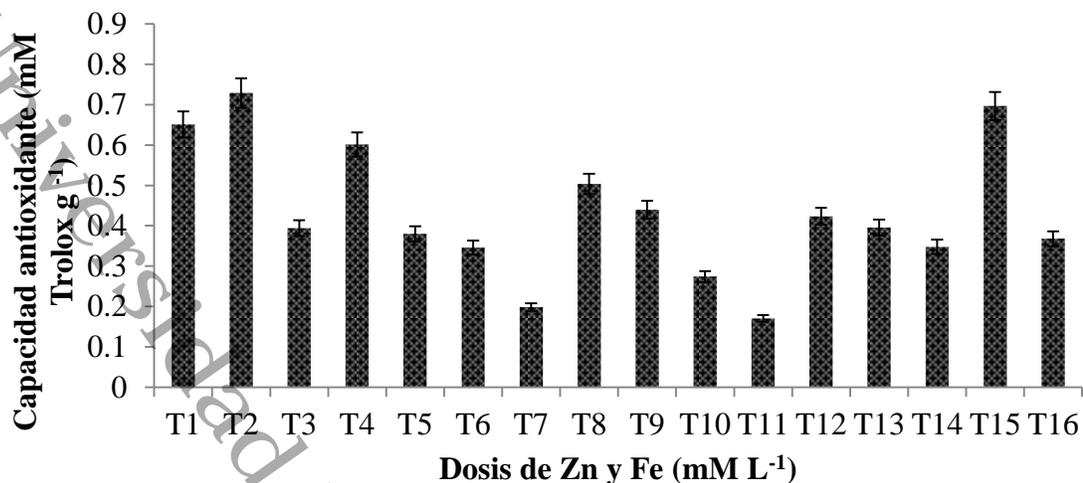
\*Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales ( $P \leq 0.05$ ). T1=festigo.



**Figura 1.** Longitud (A) y rendimiento (B) de los germinados de frijol caupí biofortificado con hierro y zinc.

Los resultados de la capacidad antioxidante en los germinados biofortificados presentan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), entre las dosis  $ZnSO_4$  y  $FeSO_4$  con valores que oscilan entre 0.1705 y 0.7287 mM Trolox  $g^{-1}$ . Al respecto los tratamientos T2 y T15 mostraron la mayor capacidad antioxidante con respecto al testigo, mientras que los tratamientos T7 y T11 presentaron las concentraciones más bajas (figura 2). Los resultados indican que los tratamientos con dosis de zinc son los que presentan mayor capacidad antioxidante.

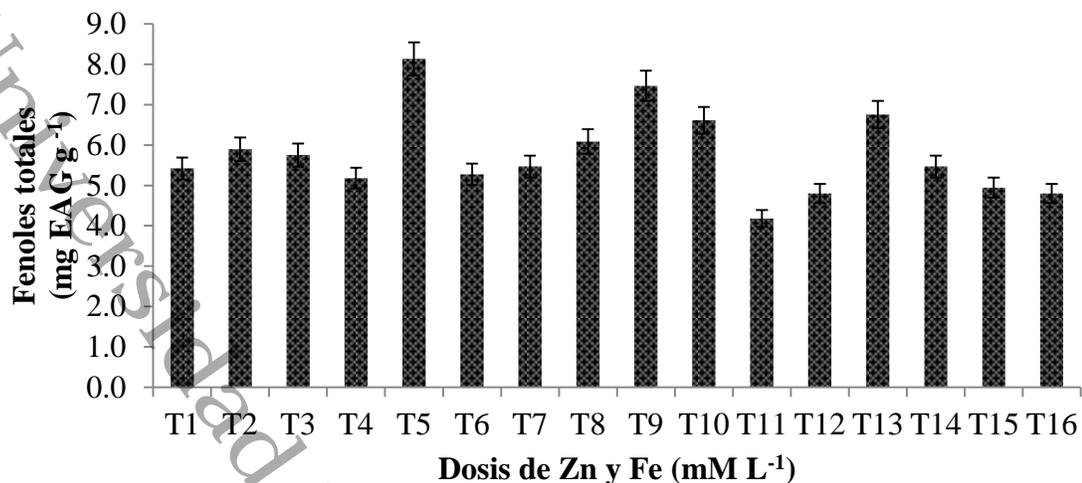
Los antioxidantes protegen al cuerpo humano contra los radicales libres, evitando el estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas. Por lo anterior, se analizó la capacidad antioxidante de los germinados biofortificados Fe y Zn, teniendo resultados superiores a los obtenidos por Kumari *et al.*, (2014) en harina de germinados de soya sin biofortificar, mientras que, son similares a los reportados por Kujawska *et al.*, 2016, que obtuvieron mayor capacidad antioxidante en germinados regados con agua destilada en comparación con los biofortificados con Fe. De ahí que Kumari *et al.* (2014), mencionen que la capacidad antioxidante después del remojo y la germinación, podría ser una respuesta que se inicia después de romper la latencia, para proteger el crecimiento del hipocótilo contra las reacciones oxidativas provocadas por factores ambientales.



**Figura 2.** Capacidad antioxidante de germinados biofortificados de frijol caupí.

Respecto al contenido de fenoles totales, presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la aplicación de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  con valores que oscilan entre 4.2 y 8.1 mg EAG  $\text{g}^{-1}$ , donde los tratamientos T9 y T5 presentaron la mayor concentración de fenoles con respecto al testigo, presentando incrementos de 38.8 y 50 % respectivamente (figura 3).

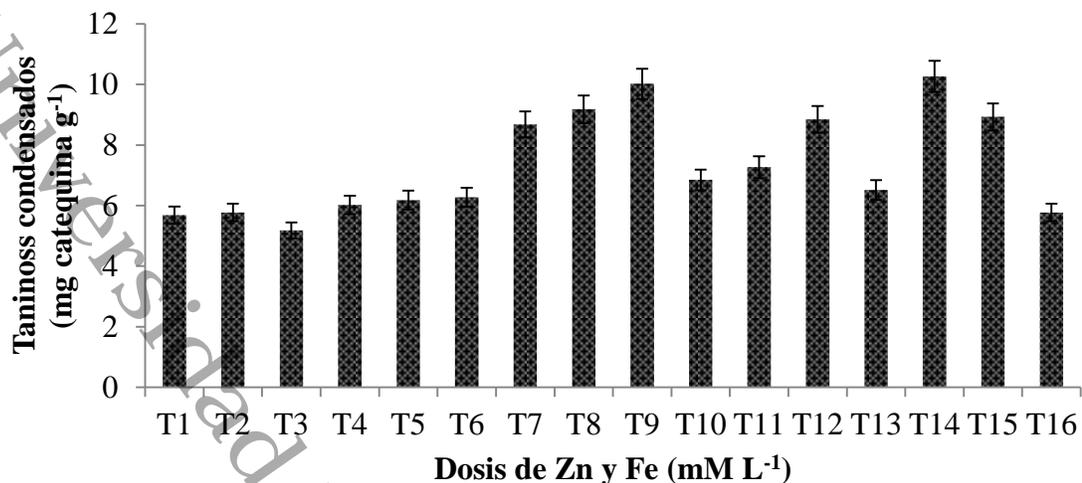
Los germinados de leguminosas tienen potencial nutracéutico que suele estar relacionado con el contenido de compuestos fenólicos que exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerosas (Chon, 2013, Dueñas *et al.* 2016) y los valores obtenidos en el presente trabajo son superiores a los reportados por Huang *et al.* (2014) y Pajak *et al.* (2014), quienes obtuvieron 1.2, 3.0 y 4.87 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de fenoles totales, respectivamente, en germinados de *Vigna radiata*, mientras que Świeca *et al.* (2012) obtuvieron 4.87 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de fenoles totales en germinados de lenteja producidos bajo oscuridad.



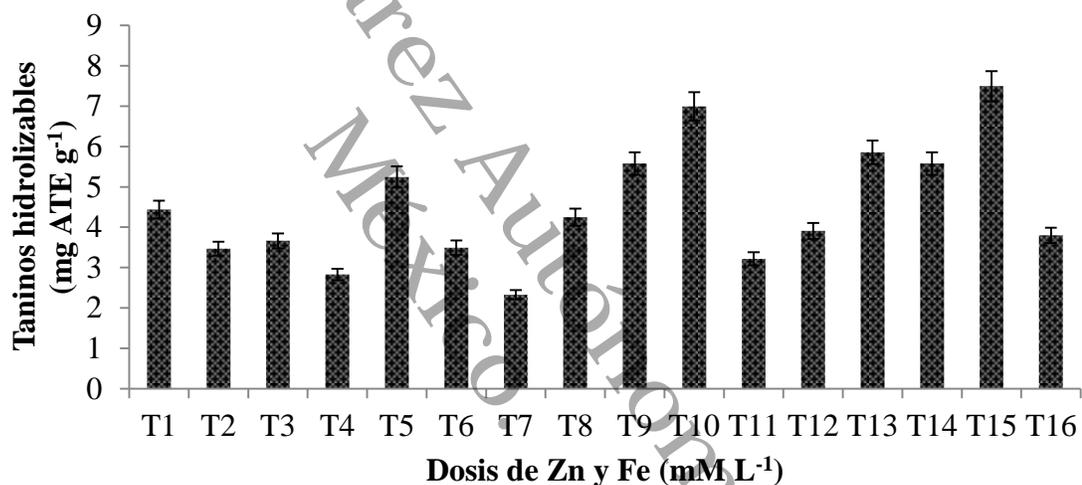
**Figura 3.** Contenido de fenoles totales de los germinados de frijol caupí.

Los resultados del estudio de los germinados biofortificados muestran que el tratamiento T3 presentó un decremento de catequina con respecto al testigo, por otro lado, el tratamiento T14 presentó un incremento de 80 % con respecto al testigo (figura 4). Mientras, en taninos hidrolizables, se presentaron entre 2.38 y 7.49 mg g<sup>-1</sup> de ácido tánico, donde los tratamientos T4 y T7 disminuyeron de 47.6 y 36.3 % respectivamente, con respecto al testigo (Figura 5).

Los taninos son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente en plantas superiores, que también son considerados antinutrientes, por lo tanto los tratamientos con dosis de 15 mM L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> presentaron los valores más altos en taninos condensados, mientras que los T4 y T7 registraron menores contenidos de taninos hidrolizables, y de acuerdo con Matuschek y Svanberg (2002), podrían ser debidas a la activación de enzimas endógenas como las hidroxilasas y polifenoloxidasas cuya actividad aumenta durante la germinación.



**Figura 4.** Contenido de taninos condensados de los germinados de frijol caupí biofortificados.



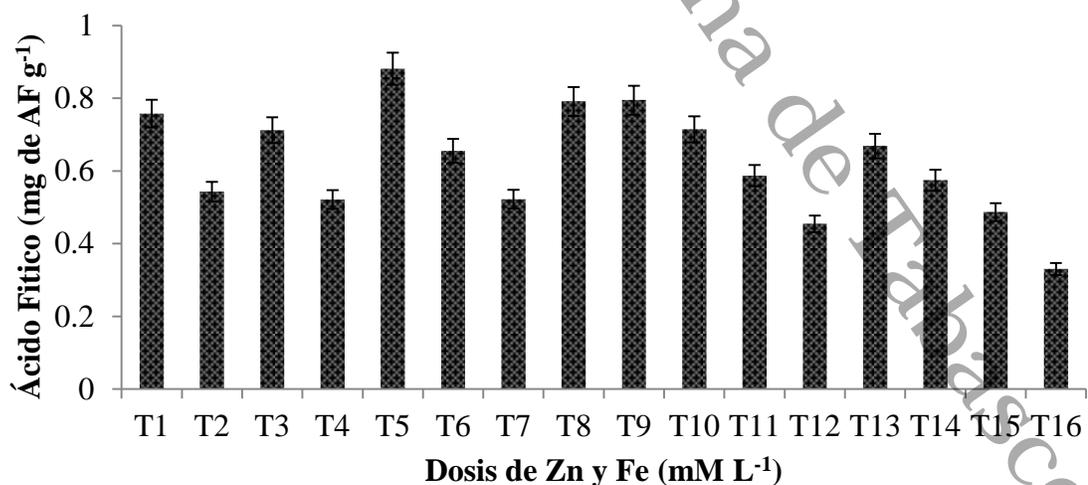
**Figura 5.** Contenido de taninos hidrolizables de los germinados de *Vigna unguiculata*.

El ácido fítico es un compuesto considerado antinutriente por su capacidad de formar complejos insolubles con proteínas y minerales como el K, Ca, Mg, Fe y Zn, sin embargo existen técnicas de procesamiento biológico entre los que se encuentran los germinados que dan lugar a la desfosforilación del fitato. En el estudio se encontraron valores que oscilan entre 0.33 y 0.88 mg g<sup>-1</sup> de ácido fítico, cabe señalar que el tratamiento T16 presentó un decremento de 56 % con respecto al testigo, mientras que el tratamiento T8 se incrementó 17 % con

respecto al testigo, sin embargo no presenta diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos y el testigo (figura 6).

De acuerdo con Kummar *et al.* (2010), las semillas de *Vigna unguiculata* tienen entre 3.9 y 13.2 mg g<sup>-1</sup> de ácido fítico, mientras que Sathe y Venkatachalam (2002) indican que durante la germinación se activa la enzima fitasa e inicia la fosforilación que reduce hasta un 90 % del ácido fítico cinco días después de la germinación. Tomando como referencia estos datos, los resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio con FeSO<sub>4</sub> y ZnSO<sub>4</sub>, al mostrar una reducción de 77 % de ácido fítico, valor inferior a lo reportado por Wei *et al.* (2012) que obtuvieron valores mínimos de 4.9 mg g<sup>-1</sup> de ácido fítico con aplicaciones de 100 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>, en germinados de arroz.

Por lo anterior, los valores del presente estudio pueden ser menores por los reportados debido a las diferentes tipos de cultivo en que se reportan. Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos biofortificados y el testigo, por lo tanto la baja concentración de ácido fítico podría haber sido disminuido por el proceso de germinación y no por la biofortificación con Fe y Zn (Wei *et al.* 2013).



**Figura 6.** Contenido de ácido fítico de los germinados de *Vigna unguiculata*.

La deficiencia nutrimental provoca desordenes que afecta principalmente a mujeres embarazadas y niños, esta deficiencia se relaciona con la dieta de la población y a la falta de alimentos (Latham, 2002). En este sentido, las plantas son la principal fuente de minerales para la mayoría de la población humana. Los resultados del contenido mineral del germinado biofortificado con Fe y Zn se muestran en la Figura 2 y en el Cuadro 3.

Las aplicaciones con Fe y Zn a los germinados de frijol caupí, afectaron el contenido de N, P, K, Ca y S (cuadro 3 y figura 7). El N se incrementó 2.3 % con aplicación de 10 mM de  $\text{FeSO}_4$ , mientras que hubo un decremento de 6.1 % con aplicaciones de 15 mM de  $\text{ZnSO}_4$  (figura 7A), por otra parte en las interacciones se encontró diferencias significativas ( $P>0.05$ ) con incrementos de 0.5 y 1 % en los tratamientos T14 y T10 respectivamente, con respecto al testigo, mientras que los tratamientos T4, T8 y T11 presentaron decrementos de hasta 8 % en comparación con el testigo (cuadro 3).

Los germinados son alimentos frescos que se consumen como ensalada, son fácil de producir, y económicos, que mejoran la calidad nutricional de las semillas (Khattak *et al.*, 2007). En el presente estudio se encontró que el contenido de N oscila entre 47.2 y 52.0 g  $\text{kg}^{-1}$  (4.7 y 5.2 %), por lo tanto, estos valores se encuentran dentro del rango permitido (1.5 y 6.0 %) de la materia seca de los cultivos, que varía según la especie y la edad de la planta (Favela *et al.*, 2006).

El P presentó un incremento de 7, 10.5 y 12 % en los tratamientos T5 T9 y T10 respectivamente, con respecto al testigo, mientras que los tratamientos T15, T12 y T8 se presentaron decrementos de 8.7, 8.7 y 12 % respectivamente, en comparación con el testigo (cuadro 3), por otro lado, en los efectos principales, la aplicación de 15 mM de  $\text{ZnSO}_4$  presentó un decremento de 13.3 % y la aplicación de 10 mM de  $\text{FeSO}_4$  incremento un 3 %, con respecto al testigo (figura 7B) . La aplicación de concentraciones elevadas de  $\text{ZnSO}_4$  interfiere en la absorción y translocación del P, Ca y Fe, además de provocar desórdenes citológicos en la planta (Cakmak, 2000; Khudsar *et al.*, 2008).

El contenido de K mostró un decremento que va desde 6 a 27 % con respecto al testigo (Cuadro 3); mientras que el Ca expresó un incremento de 8 % con los tratamientos T6, T13 y T16 y con los tratamientos T14, T10 y T9 el incremento fue de 17, 17 y 25 % respectivamente, con respecto al testigo. Los efectos simples de aplicación de Zn mostró un decremento de 13 % bajo la dosis de 10 mM de  $ZnSO_4$ , y con aplicación de  $FeSO_4$  el Ca presentó incrementos de 12, 24 y 26 % bajo las dosis de 5, 15 y 10 mM de  $FeSO_4$ , respectivamente, en comparación con el testigo (figura 7D).

El contenido de S hubo un incremento significativo en todas los tratamientos, con valores que van desde el 15 hasta el 84 % con respecto al testigo, siendo el tratamiento T16 con el mayor contenido (cuadro 3).

El contenido de Ca en los germinados biofortificados con Fe y Zn tiene una tendencia hacia incrementar ligeramente conforme se incrementa la dosis de  $FeSO_4$ , este resultado contradice a lo reportado por Przybysz *et al.* (2016), quienes reportan un decremento de 3.5 a 11.8 % con aplicaciones de 6 a 24 mg  $L^{-1}$  de  $FeSO_4$ , sin embargo se incrementó con la aplicación de 36 mg  $L^{-1}$ , en germinados de *Vigna radiata*. Por otro lado, al aplicar  $ZnSO_4$ , el contenido de Ca presentó una tendencia a disminuir mientras la dosis de aplicación se fue incrementando.

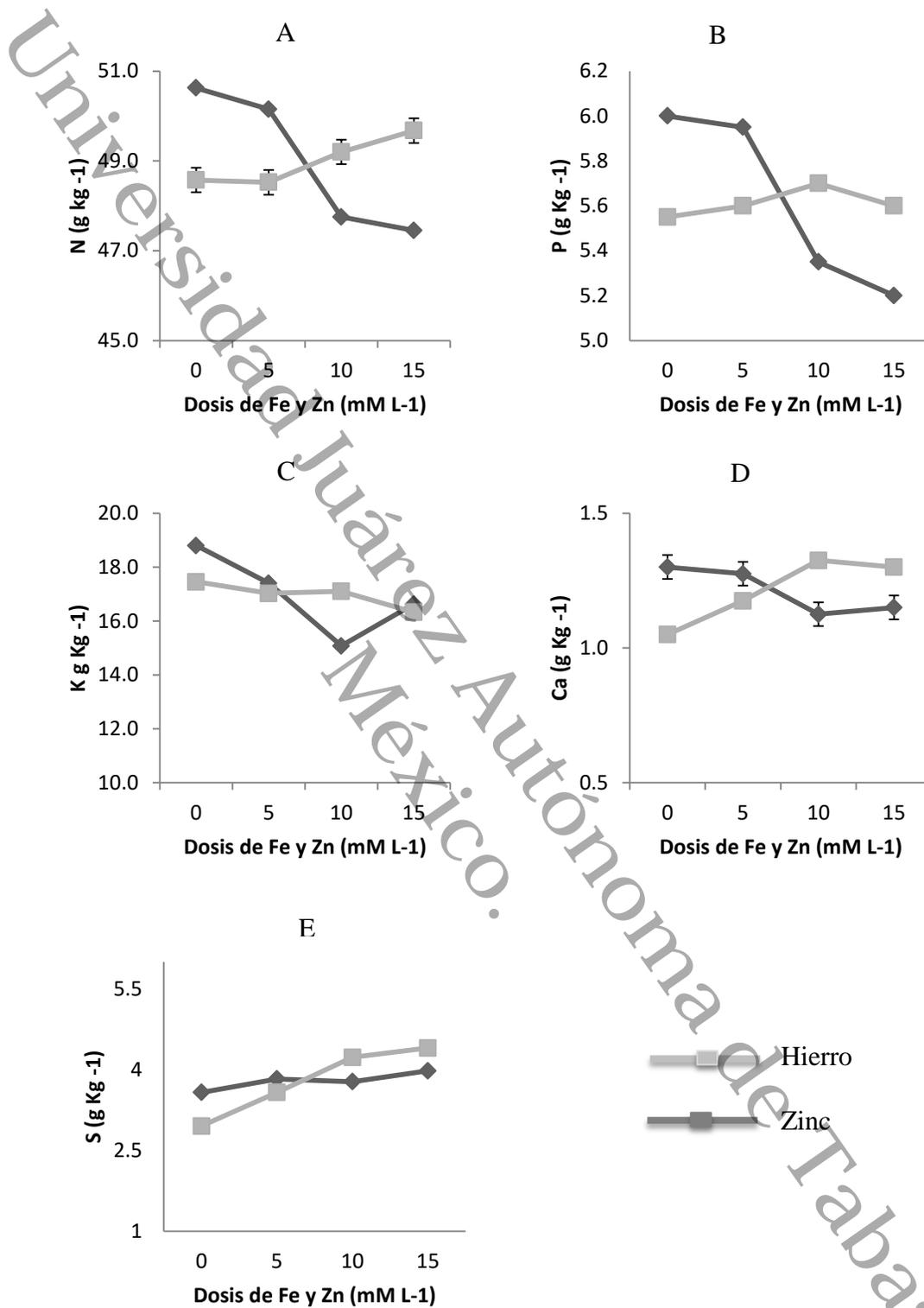
Estos resultados son inferiores a los reportados por Zou *et al.* (2014), quienes reportan un contenido de 3.32 g  $kg^{-1}$  en aplicaciones de 10 a 100  $\mu g mL^{-1}$  de  $ZnSO_4$  en germinados de soya. En este sentido, una reducción en el contenido de N, P, K y Ca puede afectar en el contenido de proteína, ácidos grasos, vitaminas y antinutrientes de los germinados (Welch y Graham, 2005).

**Cuadro 3.** Contenido mineral del germinado biofortificado con sulfato ferroso y sulfato de zinc.

Tratamiento	N	P	K	Ca	S	Fe	Zn
	(g kg <sup>-1</sup> )					(mg kg <sup>-1</sup> )	
T1	51.5 <sup>c</sup>	5.7 <sup>ef</sup>	19.7 <sup>a</sup>	1.2 <sup>cd</sup>	2.6 <sup>i</sup>	36.3 <sup>o</sup>	83.2 <sup>p</sup>
T2	48.2 <sup>h</sup>	5.6 <sup>f</sup>	17.6 <sup>f</sup>	1.0 <sup>e</sup>	3.0 <sup>h</sup>	38.9 <sup>n</sup>	1133.0 <sup>l</sup>
T3	47.4 <sup>jk</sup>	5.6 <sup>f</sup>	15.6 <sup>i</sup>	1.0 <sup>e</sup>	3.2 <sup>g</sup>	34.2 <sup>p</sup>	2077.0 <sup>h</sup>
T4	47.2 <sup>l</sup>	5.3 <sup>g</sup>	16.9 <sup>f</sup>	1.0 <sup>e</sup>	3.0 <sup>h</sup>	40.5 <sup>m</sup>	2814.0 <sup>d</sup>
T5	50.4 <sup>e</sup>	6.3 <sup>a</sup>	18.5 <sup>c</sup>	1.2 <sup>cd</sup>	3.4 <sup>f</sup>	685.0 <sup>i</sup>	95.3.0 <sup>o</sup>
T6	48.6 <sup>g</sup>	5.8 <sup>de</sup>	16.7 <sup>g</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	3.5 <sup>f</sup>	616.0 <sup>j</sup>	1494.0 <sup>i</sup>
T7	47.8 <sup>i</sup>	5.3 <sup>g</sup>	15.9 <sup>h</sup>	1.1 <sup>de</sup>	3.7 <sup>e</sup>	442.0 <sup>f</sup>	2139.0 <sup>g</sup>
T8	47.3 <sup>kl</sup>	5.0 <sup>h</sup>	17.0 <sup>f</sup>	1.1 <sup>de</sup>	3.7 <sup>e</sup>	329.0 <sup>i</sup>	2939.0 <sup>c</sup>
T9	50.0 <sup>f</sup>	6.1 <sup>b</sup>	18.8 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a</sup>	4.1 <sup>cd</sup>	1237.0 <sup>f</sup>	115.1 <sup>k</sup>
T10	52.0 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	18.3 <sup>d</sup>	1.4 <sup>b</sup>	4.4 <sup>b</sup>	1293.0 <sup>d</sup>	1131.0 <sup>m</sup>
T11	47.3 <sup>kl</sup>	5.3 <sup>g</sup>	14.3 <sup>k</sup>	1.2 <sup>cd</sup>	4.0 <sup>d</sup>	882.0 <sup>g</sup>	2475.0 <sup>f</sup>
T12	47.5 <sup>j</sup>	5.3 <sup>g</sup>	17.0 <sup>f</sup>	1.2 <sup>cd</sup>	4.4 <sup>b</sup>	791.0 <sup>h</sup>	3355.0 <sup>b</sup>
T13	50.6 <sup>d</sup>	5.9 <sup>cd</sup>	18.2 <sup>d</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	4.2 <sup>c</sup>	1707.0 <sup>b</sup>	671.0 <sup>n</sup>
T14	51.8 <sup>b</sup>	6.0 <sup>bc</sup>	17.0 <sup>f</sup>	1.4 <sup>b</sup>	4.4 <sup>b</sup>	1840.0 <sup>a</sup>	1165.0 <sup>j</sup>
T15	48.5 <sup>g</sup>	5.2 <sup>g</sup>	14.5 <sup>j</sup>	1.2 <sup>cd</sup>	4.2 <sup>c</sup>	1279.0 <sup>e</sup>	2616.0 <sup>e</sup>
T16	47.8 <sup>i</sup>	5.3 <sup>g</sup>	15.6 <sup>i</sup>	1.3 <sup>bc</sup>	4.8 <sup>a</sup>	1354.0 <sup>c</sup>	3594.0 <sup>a</sup>

\*Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ).

T1= testigo



**Figura 7.** Contenido mineral de germinados de frijol caupí biofortificados con hierro y zinc. A) Nitrógeno, B) fósforo, C) potasio, D) calcio, E) azufre.

El contenido de Fe en los germinados oscilaron entre 34 y 1840 mg Kg<sup>-1</sup>, el tratamiento T14 registró un incremento de 4968 %, en comparación con el testigo; sin embargo, el tratamiento T3 presentó un decremento de 5 % de Fe en comparación con el testigo (cuadro 3). Por otra parte, los resultados indican que la concentración de Fe fue afectada por la aplicación de Zn, donde se incrementó un 3 % con la aplicación de 5 mM de ZnSO<sub>4</sub> (figura 8A).

Los resultados muestran que la concentración de Fe depende de las dosis de aplicación de Zn, de acuerdo con Benavides-Mendoza (2002), la concentración y biodisponibilidad del Fe depende de la concentración del Zn por lo que una toxicidad por Zn induce a una deficiencia de Fe a través de reducciones en la síntesis de clorofila y degradación de cloroplastos (Broadley *et al.* 2007). En este sentido, se ha observado que el transportador regulador de hierro 1 y 3 (IRT1 e IRT3), pertenecientes a la familia ZIP, presentan afinidad para acumular Fe y Zn al interior de la célula vegetal (Guerinot, 2000; Lin et al., 2009; Waters y Sankaran, 2011), de manera que la adición de 10 y 15 mM L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> posiblemente modificó la translocación del Fe en el germinado.

Aunado a lo anterior, Rama y Prasad (1999), mencionan que el incremento de Fe en los vegetales tiene una estrecha relación con la ferritina, proteína que funciona como regulador de este elemento para proteger a las plantas de los efectos tóxicos. De manera que Zielinska-Dawidziak (2012), concluyen que los germinados de soya biofortificados con FeSO<sub>4</sub> son una fuente de ferritina rentable para el complemento en la dieta humana.

Asimismo, el Zn, es un nutrimento esencial en plantas, animales y seres humanos. En las plantas, la deficiencia de Zn reduce el crecimiento, la floración y la producción de granos mientras que en los seres humanos, la deficiencia de Zn se asocia con las complicaciones de la salud, incluyendo las deficiencias del crecimiento físico, el sistema inmunológico y la capacidad de aprendizaje, combinado con un mayor riesgo de infecciones, daños en el ADN y el desarrollo del cáncer (Levenson y Morris, 2011 y Poblaciones *et al.* 2016).

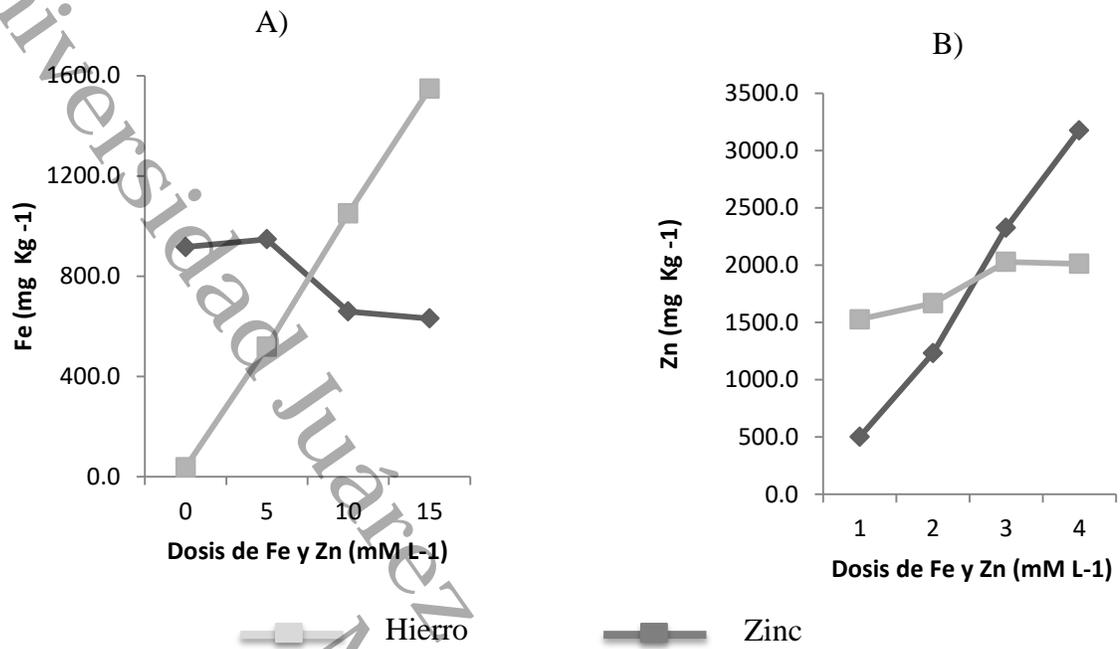
El contenido de Zn mostró valores que oscilan de 83 a 3594 mg kg<sup>-1</sup>, siendo el tratamiento T16 que presentó un incremento de 4219 %, en comparación con el testigo; mientras el Zn presentó valores que van desde 1526 a 2028 mg kg<sup>-1</sup> con un incremento de 9 a 33 % en las aplicaciones de FeSO<sub>4</sub> (figura 8B).

Las aplicaciones de ZnSO<sub>4</sub> muestran una tendencia a incrementar el mismo elemento mientras las dosis fueron aumentando, que van desde 1133 a 3594 mg kg<sup>-1</sup>, el cual indica que por cada gramo de germinado se consume entre 1.3 y 3.5 mg de Zn que representa el 11.33 a 23.9 % de Zn que se necesita ingerir por día, tomando en cuenta que la ingesta diaria recomendada por el Instituto Nacional de Salud de EEUU va de 10 a 15 mg.

La tendencia del incremento del Zn en esta investigación es similar a lo reportado por Wei *et al.* (2012), quienes presentan un incremento de Zn en germinados de arroz biofortificados, con valores que oscilan entre 29.7 y 139.8 mg kg<sup>-1</sup> con aplicaciones de 25 a 250 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Cabe resaltar que la concentración de Zn en los germinados no se afecta por la presencia de Fe el cual presentó incrementos de 9.1 a 32.8 %, con respecto al testigo, este resultado es similar a lo reportado por Przybysz *et al.* (2016), quienes reportaron un incremento de Zn de 5.6 a 42.3 % en alfalfa (*Medicago sativa* L.). Los resultados del presente estudio, indican que una dosis creciente de FeSO<sub>4</sub> en la solución permite un aumento del mismo elemento en los germinados biofortificados, sin embargo estos valores son inferiores a los reportados por Kujawska *et al.* (2016) y Zielińska-Dawidziak y Siger (2012), quienes obtuvieron un contenido de 560 y 311.56 mg de Fe por 100 g de materia seca en germinados de soya con aplicación de 20 mM de FeSO<sub>4</sub>, respectivamente. Por otro lado, los resultados obtenidos presentan la misma tendencia a los reportados por Zou *et al.* (2014), quienes mencionan un decremento en el contenido de Fe al aplicar diferentes dosis de ZnSO<sub>4</sub>.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la biofortificación pudo incrementar significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el contenido de Fe y Zn en los germinados de frijol caupí. De modo similar, se ha reportado en

varios estudios este efecto en otros germinados de leguminosas biofortificadas (Lingyun *et al.*, 2016; Przybysz *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Contenido de hierro y zinc en los germinados de frijol caupí biofortificados. A) Hierro, B) zinc.

## VII.- CONCLUSIONES

De acuerdo a las variables respuesta, los tratamientos T2, T6, T10 y T14 fueron los que obtuvieron mejores resultados por lo que, la biofortificación de germinados de *Vigna unguiculata* con sulfato ferroso y sulfato de zinc afectó el rendimiento, la capacidad antioxidante y el contenido mineral. Por lo tanto se concluye que además de consumir germinados ricos en minerales, al biofortificarlos se obtiene un producto con antioxidantes, fitoquímicos y una baja concentración de ácido fítico.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada BA, Gutierrez-Uribe JA, Serna-Saldivar SO. (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46-55.
- Adom KK y Liu RH. (2002) Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182-6187.
- Almendros P, Obrador A, Gonzalez D, Alvarez JM. (2015) Biofortification of zinc in onions (*Allium cepa* L.) and soil Zn status by the application of different organic Zn complexes. *Scientia Horticulturae*, 186: 254-265.
- Alvarez JM. 2010. Influence of soil type and natural Zn chelates on flax response, tensile properties and soil Zn availability. *Plant Soil*, 328 217–233.
- Apáez-Barrios P, Escalante-Estrada JAS, Rodríguez-González MT. (2013) Producción De Vaina Verde En Frijol Chino Y Tipo De Espaldera En Clima CÁLido. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIX: 129-140.
- Avanza MV, Chaves MG, Acevedo BA, Añón MC. (2012) Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 49: 123-130.
- Baglieri A, Cadili V, Monterumici CM, Gennari M, Tabasso S, Montoneri E, y Negre M. (2014). Fertilization of bean plants with tomato plants hydrolysates. Effect on biomass production, chlorophyll content and N assimilation. *Scientia Horticulturae*, 176, 194-199.
- Bains K, Uppal V, Kaur H. (2014) Optimization of germination time and heat treatments for enhanced availability of minerals from leguminous sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 1016-1020.
- Baloch FS, KarakÖY T, DemİRbaŞ A, Toklu F, ÖZkan H, HatİPoĖLu R. (2014) Variation of some seed mineral contents in open pollinated faba bean (*Vicia faba* L.) landraces from Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38: 591-602.
- Bashir K, Takahashi R, Nakanishi H, Nishizawa NK. (2013) The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 4: 15.

- Bejarano A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E, Peix A. (2014) *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of Genisteeae legumes and by a new symbiovar (*vignae*) of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 37: 533-540.
- Benavides-Mendoza, A. (2000) Absorción y asimilación de hierro en las plantas. *Ciencia UANL*. 3: 50-57.
- Benavides-Mendoza, A. (2002) Ecofisiología y Bioquímica del estrés en plantas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 87-157
- Benítez V, Cantera S, Aguilera Y, Mollá E, Esteban RM, Díaz MF, Martín-Cabrejas MA. (2013) Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food research international*, 50: 64-69.
- Benítez Zequeira DE. (2006) Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25 (2): 0-0.
- Blair MW. (2013) Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 8287-8294.
- Borisova MP, Kataev AA, Mavlyanov SM, y Abdullajanova NG. (2015). Effects of hydrolysable tannins on native and artificial biological membranes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series a: Membrane and Cell Biology*, 9(1), 53-60.
- Bouchenak M, Lamri-Senhadji M. (2013) Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of Medicinal Food*, 16: 185-198.
- Bouis HE, Hotz C, McClafferty B, Meenakshi J, Pfeiffer WH. (2011) Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin*, 32: S31-S40.
- Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F. (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1800 (8): 806-814.

- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677-702.
- Cabrera TC, Serrano DS. (2014) Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 14 (1): 55-60
- Caceres PJ, Martinez-Villaluenga C, Amigo L, Frias J. (2014) Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*, 152: 407-414.
- Cakmak I. (2000) Tansley Review No. 111. Possible roles of zinc in protecting plant cell from damage by reactive oxygen species. UK. *New Phytologist*. 146: 85-205.
- Cakmak I, Kirkby EA. (2008) Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiologia Plantarum*, 133: 692-704.
- Cakmak I, Pfeiffer WH, McClafferty B. (2010) Review: Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry*, 87: 10-20.
- Caldas GV, Blair MW. (2009) Inheritance of seed condensed tannins and their relationship with seed-coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics Theoretische and Angewandte Genetik*, 119: 131-142.
- Carunchia, M., Wang, L., y Han, J. (2015). The use of antioxidants in the preservation of snack foods. *Handbook of antioxidants for food preservation*, 447-474.
- Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L. (2010) Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119: 1485-1490.
- Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. (2016) Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 21: 113-132.
- Choe E, Min DB. (2005) Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *Journal of Food Science*, 70: R142-R159.

- Choe E, Min DB. (2009) Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 345-358.
- Chon SU. (2013) Total Polyphenols and Bioactivity of Seeds and Sprouts in Several Legumes. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6112-6124.
- CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. (2016) resúmenes mensuales de temperatura y lluvias. disponible en:  
<http://smn.cna.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Pron%C3%B3stico%20clim%C3%A1tico/Temperatura%20y%20Lluvia/TMED/2016.pdf>.  
Fecha de consulta: 19 de enero de 2017.
- Dai J, Mumper RJ. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313.
- Das S, Green A. (2013) Importance of zinc in crops and human health. *Journal of SAT Agricultural Research*, 11: 1-7.
- Davila M, Sangronis E, Granito M. (2003) Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53: 348-354.
- De Vega MR, Sangronis E. (2006) Influencia de la germinación en la composición del *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis*. *Agronomía Tropical*, 56: 531-537.
- Devi CB, Kushwaha A, Kumar A. (2015) Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science and Technology* 52: 6821-6827.
- Díaz AM, Caldas GV, Blair MW. (2010) Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International* 43: 595-601.
- Dixit P, Ghaskadbi S, Mohan H, Devasagayam TP. (2005) Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds. *Phytotherapy Research*, 19 (11): 977-983.
- Dueñas M, Sarmiento T, Aguilera Y, Benitez V, Mollá E, Esteban RM, y Martín-Cabrejas MA. (2016). Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris*

- L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 66: 72-78.
- Dumas JBA. 1831. Procédés de l'analyse organique. France. *Annales de Chimie et de Physique*, 47:198-212.
- Duranti M. (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77: 67-82.
- Dwivedi SL, Sahrawat KL, Rai KN, Blair MW, Andersson MS, Pfeiffer WH. (2012) Nutritionally enhanced staple food crops. *Plant Breeding Reviews*, 36: 169-291.
- FAO (2014) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. En: <http://www.fao.org/3/a-i4175e.pdf>. Revisado el 25 de noviembre 2016.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. 2016. 2016 Año Internacional de las leguminosas. <http://www.fao.org/news/story/es/item/454485/icode/>.
- Favela E, Preciado P, y Benavides-Mendoza A. (2006) Funciones de los nutrimentos en las plantas. Manual para la preparación de soluciones nutritivas. Departamento de Horticultura. UAAAN Torreón, Coahuila. México. 15-31 pp.
- Febles CI, Arias A, Hardisson A, Rodríguez-Alvarez C, Sierra A. (2000) Phytic acid level in edible grain derivatives in the Canary Islands (gofio and frangollo). *European Food Research and Technology*, 210: 346-348.
- Fernandez-Orozco R, Frias J, Zielinski H, Muñoz R, Piskula MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. (2009) Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 885-892.
- Fernandez-Orozco R, Frias J, Zielinski H, Piskula MK, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. (2008) Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111: 622-630.

- Fernandez-Orozco R, Piskula MK, Zielinski H, Kozłowska H, Frias J, Vidal-Valverde C. (2006) Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223: 495-502.
- Figueroa-Cares I, Martínez-Damián MT, Rodríguez-Pérez E, Colinas-León MT, Valle-Guadarrama S, Ramírez-Ramírez S, Gallegos-Vázquez C. (2010) Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia* 44: 763-771.
- Forrellat Barrios M, Gautier du Défaix Gómez H, Fernández Delgado N. (2000) Metabolismo del hierro. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16: 149-160.
- Ghiassi Tarzi B, Gharachorloo M, Baharinia M, Mortazavi SA. (2012) The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4): 1137-1143.
- Giami SY. (2005) Compositional and nutritional properties of selected newly developed lines of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 665-673.
- Gomez-Galera S, Rojas E, Sudhakar D, Zhu C, Pelacho AM, Capell T, Christou P. (2010) Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research*, 19: 165-180.
- Graf E, y Eaton JW. (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 8:61-69.
- Guerinot ML. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes*.1465:190-198.
- Guo R, Yuan G, Wang Q. (2011) Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae* 128: 159-165.
- Hadley CW, Miller EC, Schwartz SJ, Clinton SK. (2002) Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Experimental Biology and Medicine* 227: 869-880.

- Hafeez B, Khanif YM, y Saleem M. (2013) Role of zinc in plant nutrition-a review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2): 374-391.
- Hasler CM. (2002) Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132: 3772-3781.
- Hassanpour S, MaheriSis N, Eshratkhah B, Baghbani mehmandar F. (2011) Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion (IJFSE)*, 1(1), 47-53
- Haug W, Lantzsch HJ. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34: 1423-1426.
- Hotz C, y Brown K. (2004). Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin*, S94-S203.
- Huang X, Cai W, y Xu B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max L.*) and mung bean (*Vigna radiata L.*) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268-276.
- Hussein M, Balbaa L, Gaballah M. (2007) Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. *Research Journal of Agriculture and biological Sciences*, 3: 321-328.
- Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Sayyar Khan M. (2006) Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97: 331-335.
- Isaza JH. (2007) Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica*, 1(33):113-118.
- Jiang J, Xiong YL. (2016) Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120: 107-117.
- Jiménez-Zamora A, Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA. (2016) Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry*, 199: 339-346.

- Jin L, Wang Y, Iwaasa AD, Xu Z, Schellenberg MP, Zhang YG, McAllister TA. (2013) Short Communication: Effect of condensed tannin on in vitro ruminal fermentation of purple prairie clover (*Dalea purpurea Vent*)–cool-season grass mixture. *Canadian Journal of Animal Science*, 93: 155-158.
- Kaushik G, Satya S, Naik SN. (2010) Effect of domestic processing techniques on the nutritional quality of the soybean. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3: 39-46.
- Khattak AB, Zeb A, Khan M, Bibi N, Ihsanullah, y Khattak, MS. (2007) Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability in chickpea (*Cicer arietinum*, L.). *Food Chemistry*, 103(1): 115-120.
- Kestwal RM, Bagal-Kestwal D, Chiang BH. (2012) Analysis and enhancement of nutritional and antioxidant properties of *Vigna aconitifolia* sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67: 136-141.
- Khudsar T, Arshi A, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar y Iqbal M. (2008) Zinc-induced changes in growth characters, foliar properties, and Zn-accumulation capacity of pigeon pea at different stages of plant growth. *Journal of Plant Nutrition*, 31:281-306.
- Kim D-K, Jeong SC, Gorinstein S, Chon S-U. (2012) Total Polyphenols, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Different Extracts in Mungbean Seeds and Sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67: 71-75.
- Kujawska M, Ewertowska M, Ignatowicz E, Adamska T, Szaefer H, Zielińska-Dawidziak M, Jodynis-Liebert J. (2016) Evaluation of Safety of Iron-Fortified Soybean Sprouts, a Potential Component of Functional Food, in Rat. *Plant Foods Human Nutrition*, 71(1): 13-18
- Kumar V, Sinha AK, Makkar HP, y Becker K. (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120 (4): 945-959.
- Kumari S, Krishnan V, Sachdev A. (2014) Impact of soaking and germination durations on antioxidants and anti-nutrients of black and yellow soybean

- (*Glycine max.* L) varieties. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 24: 355-358.
- Lagerkvist CJ, Okello J, Muoki P, Heck S, Prain G. (2016) Nutrition promotion messages: The effect of information on consumer sensory expectations, experiences and emotions of vitamin A-biofortified sweet potato. Food Quality and Preference, 52: 143-152.
- Lagunes-Espinoza LdC, Gallardo-López F, Becerril-Hernández H, Bolaños-Aguilar E. (2008) Diversidad cultivada y sistema de manejo de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* en la región de la Chontalpa, Tabasco. Revista Chapingo Serie Horticultura, 14: 13-21.
- Lamien CE, Meda A, Mans J, Romito M, Nacoulma OG, y Viljoen GJ. (2005) Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis* JF Gmel (Combretaceae). Journal of ethnopharmacology, 96(1): 249-253.
- Latham, M. C. 2002. Human nutrition in the developing world. Spanish version. Food and Nutrition Series No. 29. FAO. Rome, Italy. 510 p.
- Lee H, Lee JY, Suh MH, Sim SS, Lee MW, y Kim CJ. (2010) Hydrolysable tannins depress cardiac papillary muscle contraction and propranolol-induced negative inotropism. Fitoterapia, 81(7), 820-825.
- Lee JH, Jeong SW, Cho YA, Park S, Kim YH, Bae DW, Chung JI, Kwak YS, Jeong MJ, Park SC, Shim JH, Jin JS, Shin SC. (2013) Determination of the variations in levels of phenolic compounds in soybean (*Glycine max Merr.*) sprouts infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Journal Science Food Agricultural, 93(12): 3081-3086.
- Levenson CW, y Morris D. (2011) Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. Advances in Nutrition 2: 96-100.
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M. (2005) Legumes of the world. Kew Royal Botanic Gardens pag. 592.
- Liang J, Han BZ, Nout MJ, Hamer RJ. (2008) Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. Food Chemistry, 110: 821-828.

- Lin, Y-F.; Liang, H-M.; Yang, S-Y.; Boch, A.; Clemens, S.; Chen, C-C.; Wu, J-F.; Huang, J-L. and Yeh, K-C. 2009. Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. UK. *New Phytologist*, 182:392-404.
- Lindh U. (2013). Biological functions of the elements. In *Essentials of Medical Geology*. Springer Netherlands, 129-177.
- Lingyun Y, Jian W, Chenggang W, Shan L. and Shidong Z. 2016. Effect of zinc enrichment on growth and nutritional quality in pea sprouts. *Journal of Food and Nutrition Research*. 4:100-107.
- López-Amorós ML, Hernández T, Estrella I. (2006) Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 277-283.
- López A, El-Naggar T, Duenas M, Ortega T, Estrella I, Hernandez T, Gomez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. (2013) Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138: 547-555.
- López de Romaña D, Castillo C, Diazgranados D. (2010) El zinc en la salud humana-1. *Revista Chilena de Nutrición*, 37: 234-239.
- Makkar HP, Blümmel M, Borowy NK, y Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2): 161-165.
- Márquez-Quiroz C, De-la-Cruz-Lázaro E, Osorio-Osorio R, Sánchez-Chávez E. (2015) Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (4): 839-847.
- Martínez Domínguez B, Ibanez Gomez MV, Rincón León F. (2002) Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52: 219-231.

- Matuschek E, Svanberg U. (2002) Oxidation of polyphenols and the effect on in vitro iron accessibility in a model food system. *Journal Food Science* 67 (1): 420–424.
- Miller NJ, Rice C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinic Science*, 84(4): 407–412.
- Mohammadi P, y Khoshgoftarmanesh AH. (2014) The effectiveness of synthetic zinc (Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Scientia Horticulturae*, 172: 117-123.
- Moraghan JT, Etchevers JD, Padilla J. (2006) Contrasting accumulations of calcium and magnesium in seed coats and embryos of *common bean* and soybean. *Food Chemistry*, 95: 554-561.
- Murgia I, De Gara L, Grusak MA. (2012) Biofortification: how can we exploit plant science and biotechnology to reduce micronutrient deficiencies? *Frontiers in Plant Science*, 4: 429-429.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199-216.
- Nair RM, Thavarajah D, Thavarajah P, Giri RR, Ledesma D, Yang R-Y, Hanson P, Easdown W, Hughes JdA, Keatinge JDH. (2015) Mineral and phenolic concentrations of mungbean [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek var. *radiata*] grown in semi-arid tropical India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39: 23-32.
- National Institutes of Health. Iron. In *Dietary Supplement Fact Sheet*; USA Government, National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements: 2016.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, Laura A, Ramos-Jimenez A. (2014). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutricion Hospitalaria*, 31: 55-66.

- Pachon H, Ortiz DA, Araujo C, Blair MW, Restrepo J. (2009) Iron, zinc, and protein bioavailability proxy measures of meals prepared with nutritionally enhanced beans and maize. *Journal of Food Science*, 74: H147-H154.
- Pajak P, Socha R, Galkowska D, Roznowski J, Fortuna T. (2014) Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143: 300-306.
- Palmer CM, Guerinot ML. (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology*, 5(5): 333-340.
- Pascual MB, Echevarria V, Gonzalo MJ, Hernandez-Apaolaza L. (2016) Silicon addition to soybean (*Glycine max* L.) plants alleviate zinc deficiency. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 108: 132-138.
- Peñarrieta JM, Tejada L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2): 68-81.
- Poblaciones MJ, Rengel Z. (2016) Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chemistry*, 212: 427-433.
- Prescha A, Biernat J, Weber R, Żuk M, Szopa J. (2003) The influence of modified 14-3-3 protein synthesis in potato plants on the nutritional value of the tubers. *Food Chemistry*, 82(4): 611-617.
- Prom-u-thai C, Rerkasem B, Yazici A, Cakmak I. (2012) Zinc priming promotes seed germination and seedling vigor of rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(3): 482-488.
- Przybysz A, Wrochna M, Małecka-Przybysz M, Gawrońska H, y Gawroński SW. (2016) Vegetable sprouts enriched with iron: Effects on yield, ROS generation and antioxidative system. *Scientia Horticulturae*, 203: 110-117.
- Rama Kumar T, y Prasad, M. (1999). Metal binding properties of ferritin in *Vigna mungo* (L.) Hepper (*Black Gram*): Possible role in heavy metal detoxification. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(4): 502-507.

- Ramírez H, Herrera-Gómez B, Benavides-Mendoza A, Rancaño-Arriola JH, Álvarez-Mares V, Amado-Ramírez C, y Martínez-Osorio A. (2010) Prohexadiona de calcio incrementa la capacidad antioxidante, el contenido de licopeno y la actividad enzimática en frutos de tomate floradade. Revista Chapingo. Serie Horticultura, 16: 155-160.
- Reddy NR. (2002) Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In N. R. Reddy & S. K. Sathe (Eds.), Food phytates (pp. 25–51). Boca Raton, Florida: CRC Press
- Ren SC, Sun JT. (2014) Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination. Journal of Functional Foods, 7: 298-304.
- Restrepo MVM. (2015). Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de la cáscara y la semilla de *annona muricata* y de las hojas *brownea ariza*. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, 24:143-151.
- Rivera Dommarco JÁ. (2012) Deficiencias de micronutrientes en México: un problema invisible de salud pública. Salud Pública de México, 54: 101-102.
- Rodríguez-Licea G, García-Salazar JA, Rebollar-Rebollar S, Cruz-Contreras AC. (2010) Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. Paradigma Económico, 2: 121-145.
- Rubio C, González DW, Martín-Izquierdo RE, Revert C, Rodríguez I, y Hardisson A (2007) El zinc: oligoelemento esencial. Nutrición Hospitalaria, 22(1):101-107.
- Sangronis E, y Machado CJ (2007) Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. LWT Journal Science Technology, 40:116-120.

- Sathe SK, Venkatachalam M. (2002) Influence of processing technologies on phytate and its removal. In N. R. Reddy & S. K. Sathe (Eds.), Food phytates (pp. 157-194). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- SIAP (2013) Servicio de información Agrícola y Pecuaria. Avance de siembras y cosechas resumen nacional por estado [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do).
- SIAP (2016) Servicio de información Agrícola y Pecuaria. Anuario estadístico de la producción agrícola. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp)
- Schoolchildren IB. (2010) Niveles plasmáticos de hierro, cobre y zinc en escolares Bari. *Pediatría (Asunción)*, 37 (2): 112-117.
- Smoleń S, Kowalska I, Sady W. (2014) Assessment of biofortification with iodine and selenium of lettuce cultivated in the NFT hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 166: 9-16.
- Smýkal P, Coyne CJ, Ambrose MJ, Maxted N, Schaefer H, Blair MW, Berger J, Greene SL, Nelson MN, Besharat N, Vymyslický T, Toker C, Saxena RK, Roorkiwal M, Pandey MK, Hu J, Li YH, Wang LX, Guo Y, Qiu LJ, Redden RJ, Varshney RK. (2015) Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1-3): 43-104.
- Sotelo A, Mendoza J, Argote RM. (2002) Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46: 301-306.
- Subbaiah LV, Prasad TNVKV, Krishna TG, Sudhakar P, Reddy BR, Pradeep T. (2016) Novel Effects of Nanoparticulate Delivery of Zinc on Growth, Productivity, and Zinc Biofortification in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(19): 3778-3788.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. (2009) Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6): 2167-2180.

- Świeca M, Gawlik-Dziki U, Kowalczyk D, y Złotek U. (2012) Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. *Scientia Horticulturae*, 140: 87-95.
- Świeca M, Gawlik-Dziki U. (2015) Effects of sprouting and postharvest storage under cool temperature conditions on starch content and antioxidant capacity of green pea, lentil and young mung bean sprouts. *Food Chemistry*, 185: 99-105.
- Tekale SS, Jaiwal BV, Padul MV. (2016) Identification of metabolites from an active fraction of *Cajanus cajan* seeds by high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 211: 763-769.
- Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, y Barry TN. (1992) Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(3): 321-329.
- Tiwari U, Cummins E. (2013) Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre-and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, 50(2): 497-506.
- Torres-Domínguez A. (2009) Zinc: Relación con el estrés oxidativo y la diabetes. *Bioquímica*, 34: 190-196.
- Vidal-Valverde C, Frias J, Sierra I, Blazquez I, Lambein F, Kuo Y-H. (2002) New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215(6): 472-477.
- Vijaykumar A, Saini A, Jawali N. (2010) Phylogenetic analysis of subgenus *vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. *The Journal of Heredity*, 101(2): 177-188.
- Wang X, Yang R, Jin X, Shen C, Zhou Y, Chen Z, Gu Z. (2016) Effect of supplemental  $Ca^{2+}$  on yield and quality characteristics of soybean sprouts. *Scientia Horticulturae*, 198: 352-362.

- Watchararparpaiboon W, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. (2010) An improved process for high quality and nutrition of brown rice production. *Food Science and Technology International*, 16(2): 147-158.
- Waters BM y Sankaran RP. (2011) Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science*, 180 (4): 562-574.
- Wei Y, Shohag MJ, Wang Y, Lu L, Wu C, Yang X. (2012) Effect of zinc sulfate fortification in germinated brown rice on seed zinc concentration, bioavailability, and seed germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7): 1871-1879.
- Wei Y, Shohag MJ, Ying F, Yang X, Wu C, Wang Y. (2013) Effect of ferrous sulfate fortification in germinated brown rice on seed iron concentration and bioavailability. *Food Chemistry*, 138(2): 1952-1958.
- Welch RM y Graham RD. (2005) Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4): 299-307.
- White PJ, Broadley MR. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science*, 10(12): 586-593.
- White PJ, Broadley MR. (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.
- White PJ, Broadley MR, Gregory PJ. (2012) Managing the Nutrition of Plants and People. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012: 1-13.
- Williams DJ, Edwards D, Hamernig I, Jian L, James AP, Johnson SK, Tapsell LC. (2013) Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52: 323-333.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. (2000) Engineering the Provitamin A ( $\beta$ -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science*, 287(5451): 303-305.
- Zhao J, Ge LY, Xiong W, Leong F, Huang LQ, Li SP. (2016) Advanced development in phytochemicals analysis of medicine and food dual

purposes plants used in China (2011-2014). Journal of chromatography A, 1428: 39-54.

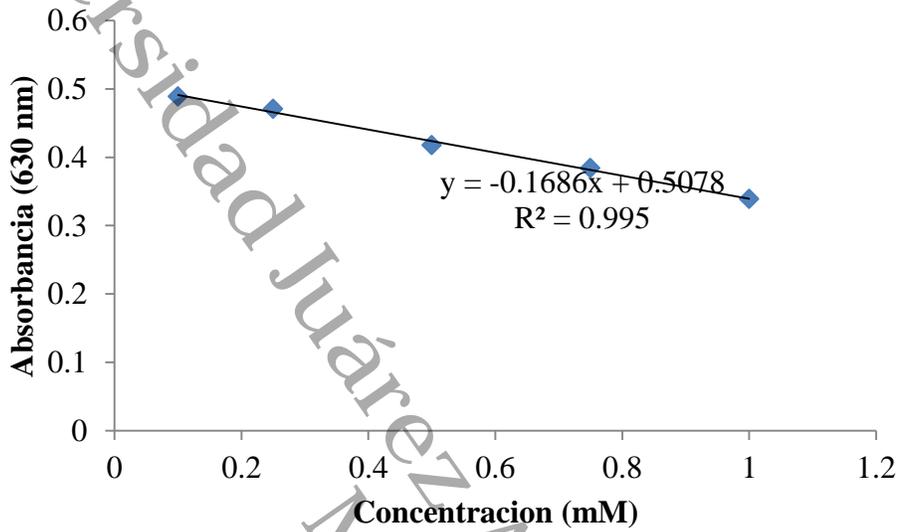
Zielińska-Dawidziak M, Siger A. (2012) Effect of elevated accumulation of iron in ferritin on the antioxidants content in soybean sprouts. European Food Research and Technology, 234(6): 1005-1012.

Zou T, Xu N, Hu G, Pang J, Xu H. (2014) Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. Journal Science of Food and Agriculture, 94(14): 3053-3060.

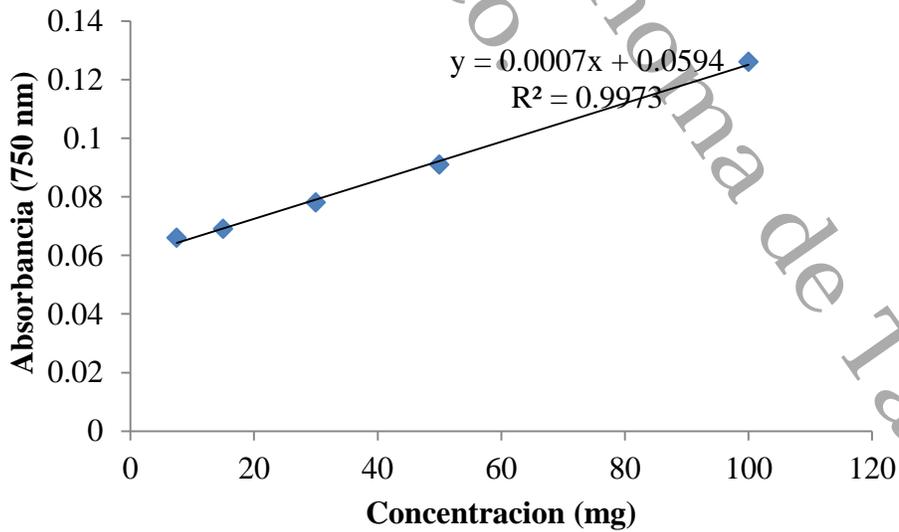
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## VII.- ANEXOS

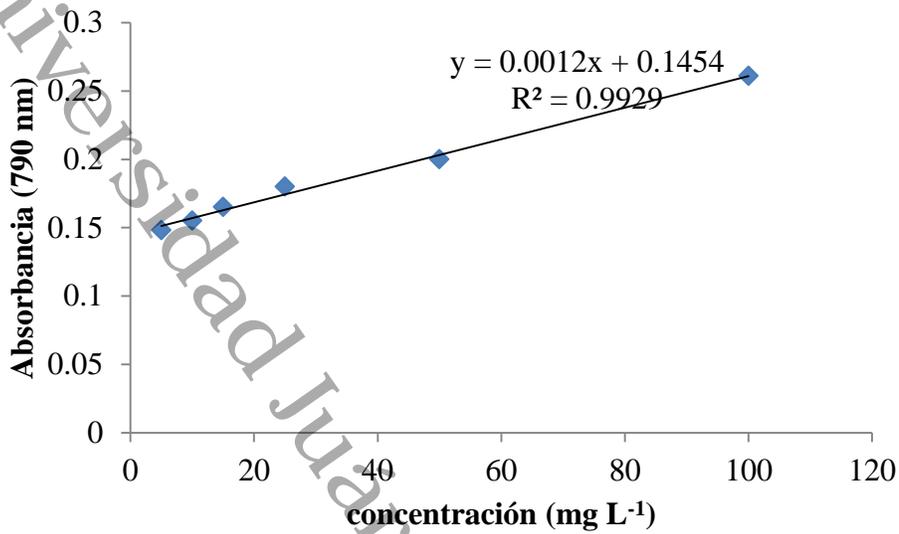
**Anexo 1.-** Curva de calibración de Trolox para cuantificación de capacidad antioxidante



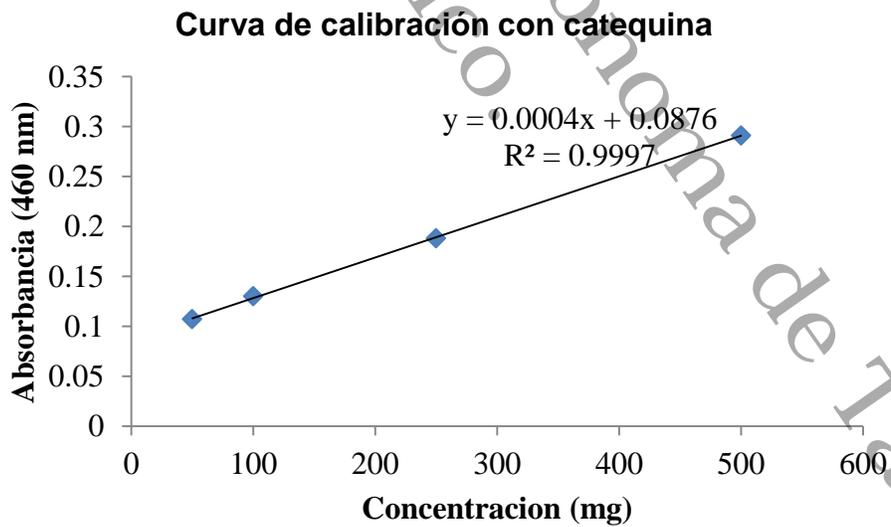
**Anexo 2.-** Curva de calibración de fenoles totales con ácido galico



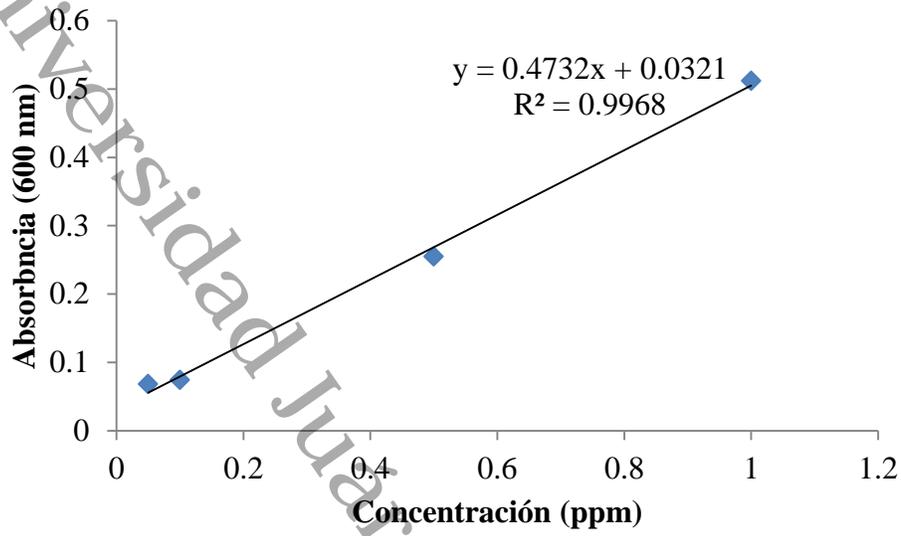
**Anexo 3.-** Curva de calibración con ácido tánico para taninos hidrolizables



**Anexo 4.-** Curva de calibración con catequina para taninos condensados



**Anexo 5.-** Curva de calibración con fósforo para ácido fitico



# Capacidad antioxidante y fitoquímicos de los germinados de *Vigna unguiculata* (L.) Walp biofortificados con hierro y zinc

INFORME DE ORIGINALIDAD

# 17%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Internet	412 palabras — 3%
2	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Internet	182 palabras — 1%
3	<a href="http://rinacional.tecnm.mx">rinacional.tecnm.mx</a> Internet	181 palabras — 1%
4	<a href="http://sociales.redalyc.org">sociales.redalyc.org</a> Internet	154 palabras — 1%
5	<a href="http://indianecologicalsociety.com">indianecologicalsociety.com</a> Internet	80 palabras — 1%
6	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a> Internet	80 palabras — 1%
7	<a href="http://repositorio.uaaan.mx">repositorio.uaaan.mx</a> Internet	80 palabras — 1%
8	<a href="http://www.notulaebiologicae.ro">www.notulaebiologicae.ro</a> Internet	80 palabras — 1%
9	<a href="http://www.publish.csiro.au">www.publish.csiro.au</a> Internet	80 palabras — 1%
10	<a href="http://repositorio.uaaan.mx:8080">repositorio.uaaan.mx:8080</a> Internet	66 palabras — < 1%

11	<a href="http://journal.pan.olsztyn.pl">journal.pan.olsztyn.pl</a> Internet	51 palabras — < 1%
12	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Internet	49 palabras — < 1%
13	<a href="http://marype0303.wordpress.com">marype0303.wordpress.com</a> Internet	44 palabras — < 1%
14	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	40 palabras — < 1%
15	<a href="http://www.gob.mx">www.gob.mx</a> Internet	38 palabras — < 1%
16	<a href="http://html.pdfcookie.com">html.pdfcookie.com</a> Internet	35 palabras — < 1%
17	<a href="http://www.archivos.ujat.mx">www.archivos.ujat.mx</a> Internet	34 palabras — < 1%
18	<a href="http://rke.abertay.ac.uk">rke.abertay.ac.uk</a> Internet	32 palabras — < 1%
19	<a href="http://cpj.ahvaz.iau.ir">cpj.ahvaz.iau.ir</a> Internet	31 palabras — < 1%
20	<a href="http://repositorio.uss.edu.pe">repositorio.uss.edu.pe</a> Internet	29 palabras — < 1%
21	<a href="http://horizon.documentation.ird.fr">horizon.documentation.ird.fr</a> Internet	28 palabras — < 1%
22	<a href="http://dogadergi.ksu.edu.tr">dogadergi.ksu.edu.tr</a> Internet	27 palabras — < 1%
23	<a href="http://www.spp.org.py">www.spp.org.py</a> Internet	27 palabras — < 1%

24	Internet	26 palabras — < 1%
25	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Internet	26 palabras — < 1%
26	<a href="http://dehesa.unex.es:8080">dehesa.unex.es:8080</a> Internet	25 palabras — < 1%
27	<a href="http://doczz.es">doczz.es</a> Internet	25 palabras — < 1%
28	<a href="http://repositorioubasib.uba.ar">repositorioubasib.uba.ar</a> Internet	25 palabras — < 1%
29	<a href="http://archivos.ujat.mx">archivos.ujat.mx</a> Internet	24 palabras — < 1%
30	<a href="http://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a> Internet	23 palabras — < 1%
31	<a href="http://digital.csic.es">digital.csic.es</a> Internet	22 palabras — < 1%
32	<a href="http://webapp.ciat.cgiar.org">webapp.ciat.cgiar.org</a> Internet	21 palabras — < 1%
33	<a href="http://www.cormillot.com">www.cormillot.com</a> Internet	21 palabras — < 1%
34	<a href="http://www.omniascience.com">www.omniascience.com</a> Internet	21 palabras — < 1%
35	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Internet	19 palabras — < 1%
36	<a href="http://ir.lib.nchu.edu.tw">ir.lib.nchu.edu.tw</a> Internet	19 palabras — < 1%
37	<a href="http://scialert.net">scialert.net</a> Internet	

		19 palabras — < 1%
38	<a href="http://agrocienza-colpos.mx">agrocienza-colpos.mx</a> Internet	18 palabras — < 1%
39	<a href="http://mafiadoc.com">mafiadoc.com</a> Internet	18 palabras — < 1%
40	<a href="http://nanopdf.com">nanopdf.com</a> Internet	18 palabras — < 1%
41	<a href="http://www.saber.ula.ve">www.saber.ula.ve</a> Internet	18 palabras — < 1%
42	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Internet	17 palabras — < 1%
43	<a href="http://repositorio.chapingo.edu.mx">repositorio.chapingo.edu.mx</a> Internet	17 palabras — < 1%
44	<a href="http://repositorionacionalcti.mx">repositorionacionalcti.mx</a> Internet	17 palabras — < 1%
45	<a href="http://coek.info">coek.info</a> Internet	16 palabras — < 1%
46	<a href="http://dspace.ueb.edu.ec">dspace.ueb.edu.ec</a> Internet	16 palabras — < 1%
47	<a href="http://ciad.repositorioinstitucional.mx">ciad.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	15 palabras — < 1%
48	<a href="http://dehesa.unex.es">dehesa.unex.es</a> Internet	15 palabras — < 1%
49	<a href="http://docshare.tips">docshare.tips</a> Internet	15 palabras — < 1%
50	<a href="http://pdfs.semanticscholar.org">pdfs.semanticscholar.org</a> Internet	

15 palabras — < 1%

---

51 [repositorio.pedagogica.edu.co](http://repositorio.pedagogica.edu.co)  
Internet

15 palabras — < 1%

---

52 [www.aulamedica.es](http://www.aulamedica.es)  
Internet

15 palabras — < 1%

---

53 [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)  
Internet

15 palabras — < 1%

---

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS