

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN GERMINADOS DE LENTEJA (*Lens culinaris*) PRODUCIDOS BAJO LUZ ARTIFICIAL EN DISTINTOS RANGOS NANOMETRICOS

Solorzano Sánchez, Allan Josué (1), Ruiz Nieto Jorge Eric (2*), Sansón Gómez Diana(3π), Hernández Ruiz Jesús (4β) Javier Ulises Sotelo Gonzales (5£) Mireles Arriaga, Ana Isabel (6*)

1 Ingeniería Agronómica en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala | josue.hb26@yahoo.com

2, 3, 4, 5 Departamento de Agronomía, DICIVA, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: π[dianasg7@yahoo.com.mx], β[hernandez.jesus@ugto.mx] ¥[jorge.ruiz@ugto.mx], £[qfb.sotelo@gmail.com), *[ana.mireles@ugto.mx]

Resumen

Los germinados son un alimento popular debido a su facilidad de producción y consumo, aunado a su alto contenido de compuestos benéficos como los antioxidantes. Estos pueden neutralizar el estrés oxidativo causado por el exceso de radicales libres, que daña a las células del cuerpo y ocasiona enfermedades degenerativas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de antioxidantes en germinados de *Lens culinaris* producidos con luz artificial en distintas longitudes de onda. Se evaluó el rendimiento por medio de la materia seca y el contenido relativo de agua. Se determinó la concentración de proteínas, beta-carotenos y clorofila A y B de los germinados. La actividad antioxidante fue determinada por los Métodos del DPPH y ABTS. El contenido de compuestos fenólicos se obtuvo mediante el método Folin-Ciocalteu. Se evaluó el nivel de estrés de los germinados con la concentración de Prolina, para determinar si hay relación entre el estrés y el contenido de antioxidantes. Los resultados generales indican que se encontró mayor actividad antioxidante en el tratamiento T2, y menor actividad en el T1. Se puede concluir entonces que la luz LED azul es potencialmente generadora de germinados vegetales con una mayor cantidad de antioxidantes.

Abstract

The sprouts are popular food due to its ease of production and its high content of nutrients such as antioxidants. These antioxidants can neutralize the free radicals that are responsible for damage the cells causing degenerative diseases. The objective of this research was to evaluate the physiological and antioxidant response of *Lens culinaris* sprouts produced with artificial light at different wavelengths. The yield was evaluated by means of the dry matter and the relative water content. The concentration of proteins, beta-carotenos and chlorophyll A and B of the sprouts was determined. The antioxidant activity was determined by the DPPH and ABTS Methods. The content of phenolic compounds was obtained by the Folin-Ciocalteu method. The stress level of the sprouts was evaluated with the concentration of Proline. The results indicate greater antioxidant activity and protein content in the T2 treatment, It can be concluded then that the blue LED light is potentially a generator of vegetable germinates with a greater amount of antioxidants.

Palabras Clave

Antioxidantes; compuestos fenólicos; LED; betacarotenos; radicales libres.

INTRODUCCIÓN

Un germinado es una semilla cosechada desde 3 hasta 7 días después de su germinación, dependiendo de la especie utilizada. Se catalogan alimento listo para consumir, y se han popularizado en los últimos años debido a su facilidad de obtención y cualidades nutricionales que se adecuan al mercado actual. La lenteja germinada contiene numerosos nutrientes, como vitaminas B1, B3, B6, zinc, hierro y numerosos compuestos bioactivos con capacidad antioxidante. El consumo de estos compuestos se relaciona directamente con la disminución del riesgo de desarrollares algunos tipos de cáncer y enfermedades coronarias [1].

Existen diversas formas de modificar el contenido de antioxidantes durante producción de germinados, que puede ser mediante factores abióticos que producen cierto estrés en la planta [2]. El uso de lamparas LED con diferentes tonalidades ha mostrado efectos positivos en el contenido de antioxidantes presentes en distintas especies vegetales, es por ello que el objetivo principal de este trabajo, determinar los efectos en el contenido de antioxidantes y nutrientes en germinados de lenteja mediante la aplicación de estrés lumínico por medio de luz artificial LED en diferentes longitudes de onda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento y material vegetal

La presente investigación se llevó a cabo en una habitación oscura del Laboratorio de Fitopatología ubicado en la DICIVA, del campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato. Los germinados de lenteja se produjeron dentro de una cámara húmeda para cada tratamiento. Dicha cámara consistió en una bandeja de polietileno tereftalato o PET cubierta en el fondo con papel absorbente. Cada bandeja fue dividida en cuatro repeticiones, y en cada repetición se colocaron 100 semillas de lenteja desinfectadas. Se adicionaron 275 ml de agua destilada a cada cámara en los días 1 y 4 para cubrir los requerimientos hídricos de los germinados.

Tratamientos

Cada uno de los tratamientos consistió en una cámara húmeda expuesta a lámparas LED de 8 W, y la fuente de variación fue un color con una longitud de onda específica y un fotoperiodo de 12:12 durante 8 días. Se elaboraron así: T1, luz LED azul (139 luxes); T2, luz LED blanca (242 luxes); Control, luz natural (140 luxes). La hora de encendido y apagado fue controlada a través de un temporizador digital General Electric 15089.

Se evaluaron las siguientes variables: 1. Biomasa, por medio de materia seca en gramos. 2. Contenido Relativo de Agua, en porcentaje (%). Se utilizaron el método y ecuaciones propuesto por Villalobos [3] para calcular el CRA. 3. Longitud de radícula y plúmula, en cm, para determinar si hay relación entre tratamientos, longitud, y contenido de antioxidantes. 4. Prolina, como indicador de estrés, en $\mu\text{g mL}^{-1}$, mediante el método descrito por Montenegro *et al.* [4]. 5. Actividad antioxidante, para determinar el porcentaje (%) de actividad antioxidante que presentan los extractos de los germinados, por medio de las ecuaciones y métodos utilizando DPPH, como lo hizo Cruz [5], y ABTS, tomando como referencia a Kuskoski *et al.* [6]. 6. Compuestos fenólicos, en mg de ácido gálico, por medio del proceso descrito por Awad [7]. 7. Clorofila, por medio de la concentración de Clorofila A y B, (mg/g peso fresco), se evaluó utilizando el método descrito por Dudek *et al.* [8] y utilizando las ecuaciones publicadas por Lichtenthaler y Bushmann [9]. 8. Proteína (mg/g peso fresco), usando las técnicas reportadas por Waliszewski *et al.* [10] y Bradford [11]. 9. Beta-caroteno (mg/g peso fresco), usando el método propuesto por Lichtenthaler [12]. A todas las variables obtenidas se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y si existían diferencias significativas, una prueba múltiple de medias de Tukey (significancia = 0.05) para determinar cuáles tratamientos tuvieron aumentos significativos. Se utilizó el paquete estadístico InfoStat v. 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de las diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo físico de los germinados de lenteja se muestra en las figuras 1 y 2. Según el ANDEVA realizado, existen diferencias significativas en el tamaño de plúmula y radícula entre tratamientos. Se determinó que T1 y el Control presentan un crecimiento significativamente mayor de radícula y de plúmula sin diferencias significativas entre ellos; cualquiera de los dos tratamientos brindará resultados estadísticamente iguales. El T2 presentó resultados bajos en ambas variables y esta diferencia en el tamaño puede deberse al estrés lumínico, que depende de la intensidad de la luz a la que está expuesta la planta. Estos resultados difieren ligeramente a los obtenidos en otro experimento hecho por Paniagua [25].

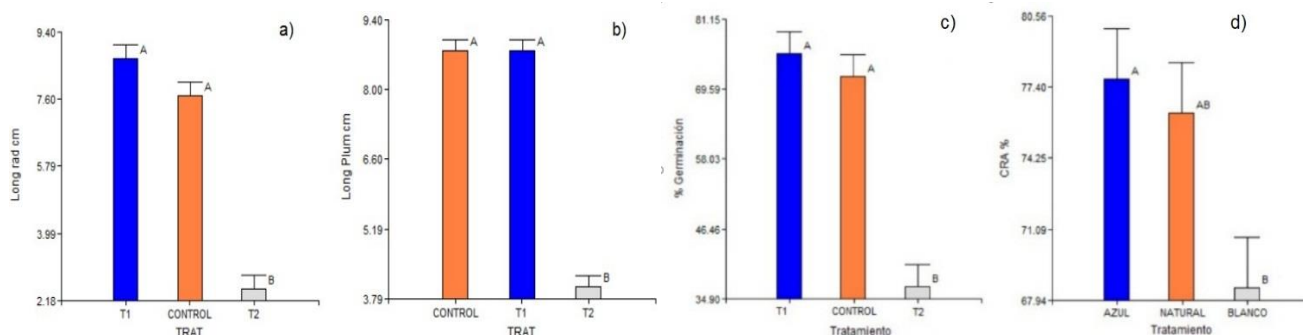


Figura 1: a) Tamaño de la radícula y b) tamaño de plúmula en germinados de lenteja expresada en cm. c) porcentaje de germinación, y d) porcentaje de CRA, en germinados de lenteja. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (alfa: 0.05).

Las características físicas medidas fueron el Contenido Relativo de Agua (CRA) y el porcentaje de germinación (PG), el T1 no presenta diferencias estadísticas con el Control, pero ambos tratamientos tienen un mayor PG, con 75.5% y 71.75% respectivamente. El T3 presenta un PG medio de 37%. En este caso, en el mismo estudio de Paniagua-Pardo [25] se obtuvieron resultados muy similares, ya que el tratamiento de la luz azul obtuvo PG entre 85% y 90%, sin embargo, la luz blanca también logró un PG de 89%, dichas diferencias pueden deberse a la especie de la semilla utilizada incluso a la intensidad de la luz.

En la figura 1c) podemos observar que T1 es el tratamiento que presenta mayor CRA. Esto quiere decir que los germinados tratados con la luz LED azul tienen cierta tendencia a resistir la sequía [26]. Estos resultados de CRA, pueden estar relacionados inversamente a la intensidad lumínica de cada tratamiento, la cual pudo haber influido en que la humedad de cada tratamiento disminuyera más rápido.

Como se muestra en la figura 3a) los tratamientos T2 y T1 presentaron una concentración significativamente mayor de compuestos fenólicos que el Control. La concentración de compuestos fenólicos fue de 0.033 mg ácido gálico/g peso fresco. Se obtuvo entonces que ambos tratamientos con luz artificial LED producen mayor concentración de compuestos fenólicos en su estructura. Un resultado similar se ha obtenido en un experimento realizado con plantas de *Medicago arborea* L. [26], en donde el tratamiento con luces LED evaluado produjo una concentración 1.12 veces mayor que un tratamiento con luz fluorescente. En otro estudio realizado en tomate de árbol [27], se obtuvo una cantidad de compuestos fenólicos dos veces más alta que en los tratamientos con luz artificial T 1 y T2. Esto puede deberse a que la longitud de onda de la luz a la que fue expuesto dicho experimento, entre 290 a 400 nm, tiene influencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos ya que numerosas enzimas son controladas por estos parámetros [29].

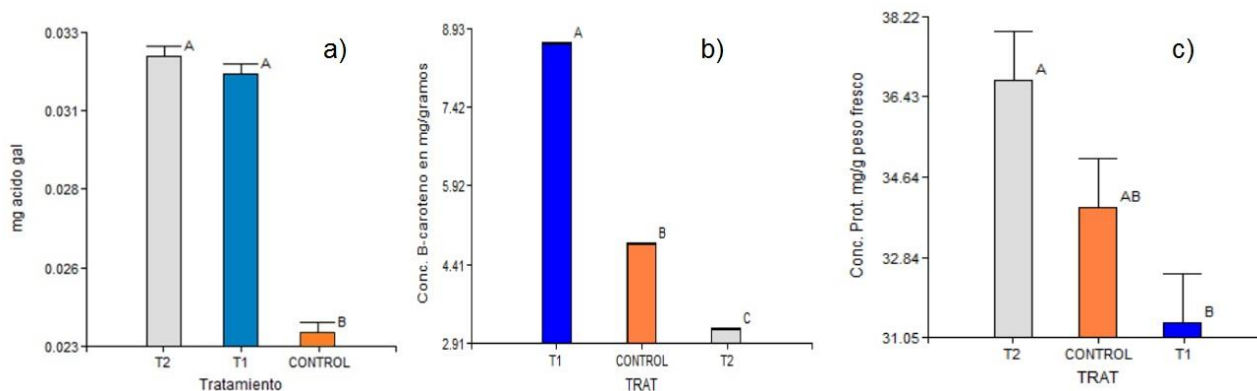


Figura 2: a) Contenido de compuestos fenólicos expresados en mg de ácido gálico/g peso fresco en germinados de lenteja. b) Contenido de proteínas expresados en mg/g de peso fresco, c) Contenido de beta-caroteno expresados en mg/g peso fresco en germinados de lenteja. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (alfa: 0.05).

El contenido proteico (Figura 2b) de los germinados presenta diferencias significativas ($p=0.0359$) entre tratamientos. El T2 presentó una concentración de proteína de 36.80 mg/g peso fresco, significativamente mayor que el Control, con 33.95 mg/g peso fresco. El T1 presentó una concentración media de 31.38 mg/g peso fresco sin diferencias significativas respecto al grupo T2, como se observa en la figura 3b. Los valores encontrados para la concentración de proteínas en los germinados de lenteja se encuentran dentro del rango reportado por otros autores para otras semillas germinadas [30].

En lo relativo al betacaroteno, el análisis mostró que existían diferencias significativas entre tratamientos, el contenido de beta-caroteno, es significativamente más alto en T1, con 8.64 ug/ml, seguido del Control con 4.82 ug/ml, y T2 con 3.18 ug/ml de media, como se observa en la figura 3c. El contenido de beta-caroteno reportado en estos resultados, es similar al que reportan otros autores para alimentos vegetales del mismo tipo [31]. Al comparar el contenido de beta-caroteno de los germinados de lenteja con espinacas (1000 mg/100 gramos), zanahoria (2000 mg/100 gramos) perejil (1160 mg/100 gramos) o aceite de soya (583 mg/100 gramos), considerados de alto contenido de beta-carotenos, podemos observar que los germinados producidos bajo luz LED azul, pueden considerarse también como un alimento con alto contenido de dicho elemento [31].

Respecto al contenido de clorofila, (Figura 4a) T1 fue el tratamiento con mayor concentración de proteína (13.5 mg/g), seguido del control (10.87 mg/g) y por último T2 (5.97mg/g). La concentración de proteína en el T1, es más alta que la producida por la luz natural del control. Esto puede estar directamente relacionado con el crecimiento de los germinados, que fue mayor en T1 y menor en T2 (Figuras 1 y 2). Los contenidos de clorofila varían ligeramente a otros obtenidos en diferentes investigaciones, siendo los de este trabajo más altos. Esto posiblemente sea debido a la influencia de la luz LED azul en la fisiología de los germinados [32].

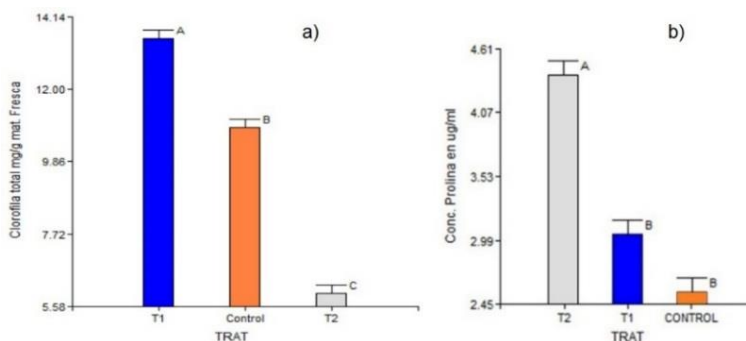


Figura 3: a) Contenido de clorofila expresados en mg/g de materia fresca, b) contenido de prolina expresados en ug/ml de materia fresca en germinados de lenteja. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas (alfa: 0.05).

La prolina, es utilizada para medir el nivel de estrés de las plantas, el tratamiento T2, produjo mayor concentración de prolina (4.39 ug/ml), mientras que el control obtuvo la menor concentración (2.55 ug/ml). El T1, con luz LED azul, mostro una concentración de 3.04 ug/ml. Es conocido que la prolina es un metabolito que se acumula con mayor frecuencia cuando las plantas se encuentran en estrés [33]. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con luz blanca provoco estrés en los germinados.

La presencia de antioxidantes se puede cuantificar por medio del porcentaje de actividad antioxidante (%AA). En este caso, se evaluó el % de inactivación del radical DPPH y el % de inhibición del radical ABTS. Ambos métodos evalúan la capacidad de los extractos de germinados de lenteja para atrapar radicales libres en medios orgánicos y acuosos, respectivamente. Los datos son presentados en porcentaje, y a pesar de medir compuestos similares, el %AA expresado por medio de DPPH fue mucho menor que el resultado obtenido a través del método ABTS. Esta situación también se dio en otros experimentos posiblemente por la mejor solubilidad de los compuestos polares en los medios acuosos en donde se realizó el ensayo ABTS [34].

Tabla 1. Promedios de Actividad antioxidante en germinados de lenteja.

TRAT	Descripción	% INACTIVACION RADICAL DPPH	% INHIBICIÓN de ABTS
T1	Luz azul	46.80	61.15
T2	Luz blanca LED	34.20	54.50
Control	Luz natural	25.45	45.29

En este caso, el tratamiento de luz azul, T1 es el que presenta mayores porcentajes de actividad antioxidante, con 46.80% y 61.15% en DPPH y ABTS, respectivamente, este resultado puede deberse al alto contenido de beta-caroteno y compuestos fenólicos que también presentó T1, ya que ambos son antioxidantes. Anteriormente, otros estudios en lentejas, han observado relación positiva entre en el contenido de fenoles, y la capacidad antioxidante [35]. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el uso de la luz LED azul, tiende a provocar una mayor concentración de antioxidantes en los germinados de lenteja.

CONCLUSIONES

El Tratamiento consistente en luz LED de color azul, con una intensidad lumínica de 139 luxes, presentó la mayor concentración de antioxidantes como Clorofila, Beta-carotenos, y compuestos fenólicos, así como mayor porcentaje de actividad antioxidante, diferenciándose estadísticamente de la luz natural y la luz LED blanca.

El Tratamiento consistente en luz LED de color azul, presentó los mayores crecimientos y desarrollos de los germinados de lenteja, diferenciándose estadísticamente de la luz natural y la luz LED blanca.

El tratamiento consistente en luz LED de color blanco, con una intensidad lumínica de 242 luxes, presentó la mayor concentración de proteína y prolina, diferenciándose estadísticamente de la luz LED azul y la luz natural.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la oportunidad que me ha dado de vivir para aprender; a mi familia, por su eterno apoyo incondicional; a la Universidad de Guanajuato, por haberme tomado en cuenta para desarrollar el Verano de Investigación Científica en su institución, porque sin duda fue una experiencia que marcó mi vida para bien; a la Universidad de San Carlos de Guatemala, mi Alma Máter, por haberme apoyado para poder realizar este intercambio académico tan valioso para mi vida profesional; a la Dra. Ana Mireles, por su paciencia, apoyo y el conocimiento que me compartió durante la estancia, para llevar a cabo una investigación de calidad.

REFERENCIAS

- [1] Figueroa, R., Tamayo, J., Gonzales, S., Moreno, G., Vargas, L. (2011). Actividad Antioxidante de Antocianinas Presentes en Cáscara de Pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 19(2), pp: 385-387.
- [2] Peterson, J., Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research Reviews*. 18 (12), pp: 1995-2018. DOI:10.1017/s0954422418000124.
- [5] Suarez, R.A., Erazzú, L.E., Mondino, M.H., Poisson, J. (s.f.). Efecto del estrés lumínico en diferentes estados del desarrollo sobre el rendimiento del cultivar de algodón Guazuncho 2 Inta. Jujuy, Argentina. Tesis de grado. Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- [6] Scalbert, A., Andres-Lacueva, C., Arita, M., Kroon, P., Manach, C., Urpi-Sarda, M., Wishart, D. (2011). Databases on Food Phytochemicals and Their Health-Promoting Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 59 (9), pp. 4331-4348. DOI: 10.1021/jf200591d
- [7] Namitha, K.K., Negi, P.S. (2010). Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 50(8), pp. 728-760, DOI: 10.1080/10408398.2010.499811
- [8] Villalobos, E., Umaña, C.H., Sterling, F. (1990). Determinación del Contenido Relativo de Agua en Progenies de Palma Aceitera Durante la Época Seca en Quepos, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 14(1), pp: 73-78.
- [9] Montenegro, S., Avallone, C., Aztarbe, M., Osuna, M., Ambrosini, S. (2004). Prolina en Miel Regional. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 7(1), pp: 87-90. Norma Iram N° 15940-2:1995.
- [10] Cruz, R. (2014). Antioxidant activity and bioactive compounds of lettuce improved by espresso coffee residues. *Food Chemistry*, 145, pp: 95-101.
- [13] Dudek, G., Grzywna, Z., Willcox, M. (2008). Classification of antituberculosis herbs for remedial purposes by using fuzzy sets. *Biosystems*, 94(1), pp: 285-289.
- [15] Lichtenthaler, H., Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley and Sons, New York, pp: F.4.3.1-F.4.3.8
- [16] Waliszewski, K., Márquez, O., Pardo, V. (2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry*, 117(2), pp: 196-203. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.118
- [17] Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp: 248-254.
- [19] Jasso, D., Rodríguez, R., García, J., Angulo, J. (2002). Caracterización de Proteínas de las Hojas y Semillas de Girasol: Relación de Biomasa y Rendimiento de Semilla. Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- [20] Paniagua-Pardo, G. (2015). Efecto de la luz LED de alta intensidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de brócoli. *Polibotánica*, 40(13), pp: 199-212. DOI: 10.18387/polibotanica.40.13
- [21] Cabrera, E. (2017). Efecto de la iluminación (tubos fluorescentes o LEDs) de las cámaras de cultivo sobre el cultivo in vitro de plántulas de *Medicago arborea*. L. Universidad Complutense de Madrid. Tesis de grado. Madrid.
- [22] Ruales, J., Ávila, J. (2016). Influencia del estrés luminoso e hídrico en la postcosecha, propiedades físico-químicas y estimación de la capacidad antioxidante del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) Genotipo gigante amarillo. *Rev Iber Tecnología Postcosecha*, 17(1), pp: 30-40.
- [24] Gaviira, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, et al. (2009). *Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (Vaccinium meridionale SW)*. *BLACPMA*, 8(6), pp: 519-528. ISSN 0717 7917.
- [25] Vicente Pascual, L. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante y su relación con la composición fenólica en lentejas. Trabajo de Fin de grado. Escuela Politécnica Superior de Zamora, Universidad de Salamanca.
- [26] Vallejo-Zamudio, E., Rojas, A., Torres, O. (2017). Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. *El Residente*, 12(3), pp:104-111.
- [27] Macheix, J., Fleuriot, A., Billot, J. (2000). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Inc: Boca Raton, Florida, pp: 378.
- [28] Martín, J., Castañeda, J. (2016). Análisis de la clorofila de spinacia oleracea y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría. *UGCiencia*, 22, pp: 99-109.