

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE Se(IV) EN PROCESOS DE BIFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS

Martínez Magaña Nury Daniela¹, Wrobel Katarzyna², Wrobel Kazimierz², Corrales Escobosa Alma Rosa², Yañez Barrientos Eunice²

¹ [Ingeniería agronómica en sistemas de producción agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala] | Dirección de correo electrónico: nurymarg97@gmail.com

² [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: eybarrientos@ugto.mx

Resumen

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación del uso de Se (IV) como estrategia de bifortificación para la mejora de la calidad nutricional de germinados, en cuanto al contenido de compuestos fenólicos libres, flavonoides y perfil ionómico; Para llevar a cabo esto, se utilizaron semillas de alfalfa, girasol, lenteja y trigo, las cuales se germinaron en sistemas hidropónicos que contenían diferentes concentraciones de Se(IV) 0.0, 1.0 y 5.0 mg L⁻¹; para la concentración de 5.0 mg de Se(IV) L⁻¹, solo las semillas de trigo y alfalfa germinaron en su totalidad, mientras que las especies de lenteja y girasol germinaron únicamente en la concentración de 1.0 mg Se (IV) L⁻¹. El contenido de compuestos fenólicos libres para la mayoría de las especies disminuyó en los tratamientos con Se(IV), excepto para la lenteja; por otro lado, el contenido de flavonoides aumentó en todas las especies en el tratamiento de 1.0 mg Se(IV) L⁻¹; por último, en la evaluación del perfil ionómico, la presencia de Se(IV) en el medio de crecimiento parece favorecer la captación de Ca en los germinados de girasol, lenteja y alfalfa, Mg en alfalfa y lenteja, K en girasol y trigo, P en trigo y Fe en germinados de girasol.

Abstract

In this work the evaluation of Se (IV) as bifortification tool for the improvement of the nutritional quality of sprouts was carried out. Content of free phenolic compounds, flavonoids and ionic profile were determined in selenized sprouts. Seeds of alfalfa, sunflower, lentil and wheat were germinated in hydroponic systems containing different concentrations of Se (IV) 0.0, 1.0 and 5.0 mg L⁻¹; for the concentration of 5.0 mg of Se (IV) L⁻¹, only wheat and alfalfa seeds germinated fully, while lentil and sunflower germinated only until concentration of 1.0 mg Se (IV) L⁻¹. Content of free phenolic compounds for almost all species decreased in the treatments with Se (IV) except for the lentil; flavonoid content increase in all species in 1.0 mg Se (IV) L⁻¹ condition; for the evaluation of the ionic profile, the presence of Se (IV) in the growth medium seems to improvement the uptake of Ca in sunflower, lentil and alfalfa, Mg in alfalfa and lentil, K in sunflower and wheat, P in wheat and Fe in sunflower sprouts.

Palabras Clave

Germinados; exposición a selenio; polifenoles; compuestos fenólicos libres, perfil ionómico

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente dos terceras partes de la población mundial sufren de enfermedades o problemas de salud provocados por la ingesta insuficiente de selenio (Se) y/o elementos minerales esenciales en la dieta diaria, en concentraciones fisiológicas adecuadas el Se participa en funciones del sistema inmune, defensa celular antioxidante, además de que se ha reportado actividad quimiopreventiva para algunos Se-compuestos de baja masa molecular [1-3]. El estatus de deficiencia de selenio y elementos esenciales puede ser revertido mediante la ingesta de alimentos fortificados, como las plantas comestibles [4]. La biofortificación de plantas representa un sistema atractivo y eficiente para regular la ingesta de estos elementos (selenio y elementos esenciales) en animales y humanos; en este proceso se incorpora cantidades supra-fisiológicas de los elementos de interés en el medio de crecimiento, sin embargo, la cantidad acumulada de dichos elementos por la planta es generalmente difícil de controlar (depende de la especie, condiciones de crecimiento y especie química aplicada para la fortificación) y por lo general es relativamente menor respecto a los productos fortificados por adición directa; sin embargo la indiscutible ventaja de biofortificación es que se asegura una forma del nutriente biodisponible que en muchos casos presenta actividad biológica benéfica para la salud de consumidores [5], así mismo, está técnica complementa otros procedimientos existentes en sistemas agrícolas de una manera relativamente rentable y sostenible [6]. Con la ayuda de los diferentes procesos de biofortificación, además de lograr la incorporación de elementos esenciales, se puede favorecer dentro de la planta la síntesis de metabolitos benéficos para la salud, provocando un aumento del valor nutricional del alimento como los aminoácidos, proteínas, vitaminas, así como metabolitos secundarios como los polifenoles, los cuales además de tener efectos benéficos en la salud de seres humanos y animales constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Se trata de compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta [7]. En este contexto, parece interesante explorar la biofortificación de los germinados de plantas comestibles, ya que tienen alto valor nutricional debido al elevado contenido de carbohidratos, proteínas, isoflavonas, vitaminas, minerales, enzimas y ácido fólico; en particular, los brotes de alfalfa, soja y lenteja son buenas fuentes de isoflavonas, que exhiben una variedad de actividades biológicas que pueden influir en el riesgo de diferentes enfermedades [8,9]. En el presente trabajo se evaluó la biofortificación de Se en diferentes especies de germinados, mediante la determinación de fenoles libres, flavonoides y elementos esenciales mayoritarios.

MATERIALES Y MÉTODOS*

Obtención de Germinados

Las semillas que se utilizaron fueron de las plantas *Medicago sativa* (alfalfa), *Helianthus annuus* (girasol), *Lens culinaris* (lenteja), *Triticum sp* (trigo), la selección de estas especies se realizó con base en los cortos periodos para la obtención de germinados, alta producción de biomasa y facilidad de crecimiento en sistemas hidropónicos.

La cantidad de semillas utilizadas para la obtención de germinados fueron 40 semillas de *Triticum. sp*, *L. culinaris* y *H. annuus* y 1.5 g de *M. Sativa*. Previo a la germinación todas las semillas fueron lavadas para eliminar posibles fuentes de contaminación, utilizando agua destilada, hipoclorito de sodio al 3.1% y etanol al 70%. La germinación se realizó en sistemas hidropónicos los cuales contenían 100 mL de la solución nutritiva Hoagland ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.35mM, KNO_3 0.255mM, MgCl_2 0.91mM, MoO_3 23.13 μM , MnCl_2 3.9 μM , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0.37 μM , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ 10 μM , CuSO_4 0.44 μM , H_3BO_3 32.13 μM , KH_2PO_4 0.97mM, CaCl_2 2.1mM, pH 5.8) y

diferentes concentraciones de selenito de sodio (Se (IV) 0.0, 1.0 y 5.0 mg Se L⁻¹). Para todas las especies el proceso de germinación comenzó con 48 hrs de oscuridad hasta el brote de las radículas, posteriormente las condiciones de crecimiento fueron fotoperiodos de 16h luz/8h oscuridad, humedad relativa 60% y temperatura de 22-25°C. Al término del periodo de germinación las plantas fueron lavadas con CaCl₂ 0.05 M y agua destilada. La biomasa obtenida fue liofilizada y homogeneizada para su posterior análisis.

Determinación de Flavonoides totales

La extracción de flavonoides totales se realizó a partir de 50 mg de biomasa liofilizada con 1.5 ml de metanol al 80%, la extracción se llevo a cabo en sonicación por 1h. Posterior a la extracción la muestra fue centrifugada a 10 000 rpm por 20 min, del sobrenadante obtenido se tomaron 150µL y se adicionaron 250µL NaNO₂ 0.5 M + 250µL AlCl₃ 0.3M, se agitó con vórtex e incubo la muestra por 5 min, posteriormente se adicionó 750µL NaOH 2.0 M, la muestra se llevó a un volumen final de 3.0 mL con metanol al 30%. La determinación del contenido de flavonoides totales se llevó a cabo espectrofotométricamente monitoreando la absorbancia a 510 nm, se utilizó el método calibración externa usando como estándar de calibración Rutin, el rango de calibración fue de 0.0 – 20 mg L⁻¹. Las soluciones de calibración fueron preparadas tal como se describió en el párrafo anterior para las muestras. Los resultados obtenidos se expresan en mg g⁻¹ de Rutin (Tabla 1)

Determinación de Fenoles libres

La extracción de los fenoles totales se realizó a partir de la misma manera que se describió para flavonoides totales, del sobrenadante obtenido se tomaron 50 µl y se adicionó 250 µl Folin-Ciocalteu 1.0 N y 250 µl carbonato de sodio 20%, la muestra se llevó a un volumen final de 3.0 mL con H₂O. La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo espectrofotométricamente monitoreando la absorbancia a 760nm, se utilizó el método de calibración externa, el estándar de calibración fue ácido gálico, el rango de calibración fue de 0.0 – 20 mg L⁻¹. Las soluciones de calibración fueron preparadas tal como se describió en el párrafo anterior para las muestras. Los resultados obtenidos se expresan en mg g⁻¹ de ácido gálico (Tabla 1).

Determinación de perfil ionómico

La determinación del perfil ionómico de los germinados crecidos en diferentes concentraciones de Se (IV), se realizó a partir de biomasa hidrolizada (30 mg de muestra liofilizada, 500 µL de HNO₃ (69%), 70°C por 30 min, 125°C 2 hr; 0.5 mL de H₂O₂, 125°C 30 min) mediante la técnica analítica de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (MP- AES). Las longitudes de onda monitoreadas fueron: 445.478 nm para Ca, 279.553nm para Mg, 259.940 nm para Fe, 589.592 nm para Na, 769.897 nm para K y 213.618 nm para P. Se utilizaron diferentes valores de presión de nebulización y posición de lectura para cada longitud de onda monitoreada. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método calibración externa, utilizando seis niveles de concentración (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 mg L⁻¹) para cada uno de los elementos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después del periodo de crecimiento se observó que para la concentración de 5.0 mg de Se(IV) L⁻¹, únicamente las semillas de trigo y alfalfa germinaron en su totalidad, mientras que las especies de lenteja y girasol germinaron únicamente en la concentración de 1.0 mg Se (IV) L⁻¹, sin presentar efectos fitotóxicos visibles en los brotes obtenidos.

La importancia de los compuestos fenólicos en distintas áreas como la agricultura, farmacéutica, nutracéutica, cosmética, entre otras; se debe a sus propiedades antioxidantes, antimicrobiales e incluso antitumorales. En las plantas se han identificado una amplia gama de los compuestos fenólicos presentes de manera natural,

así como generados por la activación del mecanismo defensivo contra el estrés, por tal motivo es que en este proyecto se realizó la determinación del contenido de compuestos fenólicos libres con el fin de evaluar el efecto de selenio en el medio de crecimiento. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 en donde se observa que cuando las semillas son germinadas con Se (IV) hay una disminución del contenido de compuestos fenólicos comparado con los tratamientos control, sin embargo, para el caso de los germinados de lenteja existe un aumento en el contenido de estos compuestos, que por la extracción utilizada podrían ser ácido quínico, ferúlico, salicílico, vanílico, cafeico o cinámico los cuales han sido ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cosmética.

Los flavonoides son una familia de metabolitos secundarios que poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y su contenido, lo cual depende de especie y condiciones ambientales. En este trabajo se realizó la evaluación de los efectos de Se(IV) en el contenido de flavonoides en distintas especies de planta. Los resultados obtenidos de la determinación se muestran en la Tabla 1, en donde se observa que los niveles de flavonoides aumentaron para todas las especies cuando las semillas fueron germinadas con Se (IV) respecto a los tratamientos control, cabe mencionar que tanto para alfalfa como trigo el mayor contenido de flavonoides se registró en el tratamiento de 1.0 mg L⁻¹, esto va de acuerdo con estudios realizados en plantas superiores en donde la síntesis de este tipo de metabolitos secundarios aumenta cuando son expuestas a bajas concentraciones de Se(IV)

Tabla 1: Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales

Muestra	mg rutin g ⁻¹	mg ác, gálico g ⁻¹	Muestra	mg rutin g ⁻¹	mg ác, gálico g ⁻¹
1. Girasol control	11.1±0.55	18.4±0.92	6. Alfalfa 1.0 mg L ⁻¹	4.65±0.23	3.88±0.19
2. Girasol 1.0 mg L ⁻¹	12.5±0.62	15.1±0.75	7. Alfalfa 5.0 mg L ⁻¹	3.80±0.19	4.34±0.21
3. Lenteja control	4.08±0.2	6.51±0.32	8. Trigo control	2.93±0.15	5.09±0.25
4. Lenteja 1.0 mg L ⁻¹	5.70±0.3	7.87±0.4*	9. Trigo 1.0 mg L ⁻¹	3.50±0.17	4.66±0.23
5. Alfalfa control	3.16±0.16	4.38±0.22	10. Trigo 5.0 mg L ⁻¹	3.33±0.16	4.94±0.24

A partir de los resultados obtenidos de la determinación del perfil ionómico (Tabla 2) por MP-AES, se puede sugerir que el proceso de bifortificación con Se (IV) puede favorecer la acumulación de algunos elementos dependiendo de la especie de planta. Los efectos más notorios en cuanto al aumento del contenido de algunos de estos elementos fueron para Ca en los germinados de girasol, lenteja y alfalfa, Mg para las especies de alfalfa y lenteja, K en girasol y P únicamente para trigo y Fe en germinados de girasol, todos estos efectos se observaron en los tratamientos con Se(IV) a 1.0 mg L⁻¹.

Tabla 2: Resultado de la determinación del perfil ionómico de los germinados obtenidos mediante MP-AES (mg g⁻¹)

Muestra	Ca	Mg	Fe	Na	K	P
1. Girasol control	9.62±0.5	5.67±0.3	0.06±0.003	2.46±0.02	14.3±0.71	11.0±0.55
2. Girasol 1.0 mg L ⁻¹	10.8±0.54	5.34±0.3	0.07±0.003*	1.57±0.1	12.6±0.63	9.1±0.45
3. Lenteja control	10.3±0.52	4.48±0.22	0.10±0.005	2.15±0.11	20.1±1.0	10.8±0.54
4. Lenteja 1.0 mg L ⁻¹	11.5±0.6*	4.87±0.24*	0.08±0.004	1.87±0.1	16.1±0.8	9.06±0.45
5. Alfalfa control	7.44±0.4	7.08±0.35	0.09±0.004	3.23±0.2	21.9±1.1	11.4±0.6
6. Alfalfa 1.0 mg L ⁻¹	8.65±0.43*	8.89±0.44*	0.04±0.002	1.28±0.1	15.0±0.8	4.95±0.25
7. Alfalfa 5.0 mg L ⁻¹	7.53±0.4	7.49±0.4	0.04±0.002	1.69±0.1	11.6±0.6	5.79±0.3
8. Trigo control	1.71±0.1	1.09±0.05	0.05±0.002	1.11±0.05	11.1±0.5	4.43±0.22
9. Trigo 1.0 mg L ⁻¹	1.17±0.1	0.93±0.05	0.03±0.001	0.81±0.04	16.01±0.8	4.58±0.23*
10. Trigo 5.0 mg L ⁻¹	1.04±0.05	0.62±0.03	0.02±0.001	0.59±0.03	9.91±0.5	3.61±0.18

Para el caso de la evaluación del efecto de Se(IV) en el perfil ionómico de germinados no hay muchos estudios realizados al respecto, por lo que estos resultados contribuyen para el diseño y desarrollo de estrategias de biofortificación de plantas comestibles con Se(IV).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen con la base de futuras investigaciones en el área de producción de alimentos funcionales, usando la biofortificación de Se(IV) para la mejora de la calidad nutricional de germinados, en cuanto al aumento del contenido de elementos esenciales así como de la producción de metabolitos secundarios a los cuales se les ha atribuido importantes efectos benéficos para la salud de humanos y animales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado al proyecto de la convocatoria Institucional 2016-2017 con el número 972/2016.

REFERENCIAS

- 1 Kieliszek, M. & Blazejak, S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*. 29(5), 713-718
- 2 Montes-Bayón, M., Molet, M., González, EB. & Sanz, A. (2006). Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*. 68(4), 1287-1293
- 3 Wróbel, K., Wróbel, K., Kannamkumarath, S., Caruso, J., Wysocka, I., Bulska, E., Świątek, J. & Wierzbicka, M. (2004). HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves—a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chemistry*. 86(4), 617-623
- 4 Gergely, V., Montes, M., Fodor, P. & Sanz, A. (2006). Selenium species in aqueous extracts of alfalfa sprouts by two-dimensional liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry detection. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54(13), 4524-4530
- 5 Bouis, H., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J. & Pfeiffer, W. (2011). Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr Bull*. 32(1 Suppl), S31-40
- 6 White, P. & Broadley, M. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science*. 10(12), 586-593.
- 7 Teoh, E. (2016). *Secondary Metabolites of Plants, in Medicinal Orchids of Asia*. Springer. 59-73
- 8 Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, J., Kuehnelt, D. & Goessler, W. (2000). 48(11), 5362-5368.
- 9 Funes, V., Morell, A., Rubio, R. & López J. (2013). Study of selenocompounds from selenium-enriched culture of edible sprouts. *Food chemistry*. 141(4), 3738-3743