

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DE CUALIDADES FUNCIONALES DE
METABOLITOS DE VARIEDADES DE QUINUA
(*Chenopodium quinoa* Willd.)

Tesis para optar al título de *Magister Scientiarum* en Ciencias Químicas

Postulante: Lic. Nancy Alejandra Navia Coarite

Tutoras: Giovanna Rocío Almanza Vega PhD.

Lily Salcedo Ortiz M.Sc.

Tribunales: Yonny René Flores Segura PhD.

Rómulo Gemio Siñani PhD.

La Paz – Bolivia

Diciembre, 2019

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico en primer lugar a Dios, por ser la luz que ilumino en todo mi camino; a mis padres Gregorio N. y Justina C. y hermanos por ser el soporte de mi superación, y una mano extendida para no dejarme caer nunca; a todos mis amigos que tuvieron una palabra de apoyo, durante este transcurso de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al proyecto “Biomoléculas de Interés Medicinal e Industrial-Anticancerígeno”, financiado por fondos de la cooperación Sueca ASDI. También quiero agradecer a la Empresa Irupana Andean Organic Food S.A. y al Municipio de Umala, por proporcionar las muestras de estudio.

A mis tutoras Giovanna Rocío Almanza Vega Ph.D. y Lily Salcedo Ortiz MSc. por brindarme el incondicional asesoramiento en la dirección de la presente investigación.

A la Carrera de Ciencias Químicas por la formación académica ofrecida.

Al Laboratorio de Bioorgánica del Instituto de Investigaciones Químicas, que me abrieron las puertas y me brindaron con el apoyo material, para realizar el respectivo trabajo de investigación.

A mis padres por brindarme el apoyo incondicional, estando junto a mí en mis triunfos y fracasos con su amor, y comprensión para seguir adelante.

A mis tribunales Rómulo Gemio Siñani Ph.D. y Yonny René Flores Segura Ph.D., por ser parte en la culminación del presente trabajo de investigación.

Y a cada una de las personas, quienes contribuyeron para que este período de mi vida rescinda con éxito.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioorgánica de la carrera de Ciencias Químicas.

El desarrollo de la Tesis consta de dos partes:

En la primera parte del trabajo, se realizó el estudio para evaluar la actividad Antihipertensiva *in vitro* de los hidrolizados y fracciones peptídicas de dos variedades de Quinoa Jacha Grano (QJG) y Quinoa Real Blanca (QRB), para obtener péptidos bioactivos.

Inicialmente, se realizó el análisis proximal de cada variedad de quinua.

Para la evaluación de la actividad antihipertensiva, primeramente, se realizó la extracción de proteínas por precipitación isoeléctrica, determinándose mayor contenido de proteína aislada en QRB (6.15 g/100 g harina) que en QJG (4.32 g/100 g harina). Luego, se procedió a realizar la hidrólisis enzimática con la Alcalasa y Flavourzima y se determinó el Grado de Hidrólisis (GH), obteniéndose mayor GH con la Alcalasa para ambas variedades de quinua (QRB 26.20 %, QJG 26.24 %) que con la Flavourzima (QRB 24.95 %, QJG 24.92 %). A partir de los hidrolizados enzimáticos con Alcalasa y Flavourzima, se realizó la separación de las fracciones peptídicas por cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-25. Finalmente se evaluó la actividad antihipertensiva de los hidrolizados y sus fracciones peptídicas para cada variedad de quinua, los resultados muestran que los hidrolizados y sus fracciones correspondientes con Flavourzima presentan una importante actividad antihipertensiva para ambas variedades de quinua, pero la que más resalta es la QRB (80.14 %) respecto a la QJG (75.42 %) para los hidrolizados, de igual manera para sus fracciones (QRB 90.0 - 4.2 %, QJG 77.9 - 34.1 %) en cambio para los hidrolizados con Alcalasa se obtuvo valores de inhibición menores para ambas variedades QRB (68.20 %) y QJG (60.20 %), de igual manera para sus fracciones (QRB 80.3 - 2.7 %, QJG 70.7 - 11.8 %). Por lo tanto, entre las dos variedades, la QRB tuvo mejores resultados de inhibición de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina).

En la segunda parte del trabajo, se realizó el estudio para evaluar el contenido de compuestos fenólicos, así como las actividades antioxidante y antitirosinasa *in vitro* de granos de variedades altamente comerciales de quinua de Bolivia, con el objetivo de determinar algunas propiedades funcionales de fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos y compuestos puros. Así, se aisló y cuantificó un flavonoide mayoritario identificado como mauritianin (Kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido). La cuantificación se realizó en los extractos hidroalcohólicos (EHA) de 4 variedades de quinua (Quinoa Jacha Grano, Quinoa Real Blanca, Quinoa Real Roja y Quinoa Real Negra), y en dos fracciones ricas en compuestos fenólicos AEA-1 y AEA-2 obtenidas de QJG, determinándose una presencia mayoritaria en AEA-1 (5.12 mg/g AEA-1) y mayor presencia en las variedades de quinua real (3.34 – 4.6 mg/g EHA) que en la QJG (2.48 mg/g EHA). En una serie de ensayos *in vitro*, se evaluaron la actividad antioxidante (contenido fenólico total y ABTS) y antitirosinasa (tirosinasa de hongos) de los EHA, fracciones ricas en compuestos fenólicos y del mauritianin, el compuesto aislado (**mauritianin**) mostro una importante actividad antitirosinasa (74.73 % de inhibición a 1,67 mg/mL) y antioxidante (826.68 mg EAG/g y 1141.38 μ M ET/g), así como la fracción AEA-1 que muestra un 69.89 % de inhibición de la enzima tirosinasa y significativa actividad antioxidante (246.08 mg EAG/g y 569.21 μ M ET/g), lo cual sugiere que estos productos tienen una potencial aplicación en dermatológica, cosmética y en el procesamiento de alimentos.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AcOEt: Acetato de etilo

AEA-1: Primera fracción - Acetato de etilo/Etanol 96°/Agua

AEA-2: Segunda fracción - Acetato de etilo/Etanol 96°/Agua

AEA-3: Tercera fracción - Acetato de etilo/Etanol 96°/Agua

AEA-4: Cuarta fracción - Acetato de etilo/Etanol 96°/Agua

Asp: Aspartato

C: Carbono

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina

EHA: Extracto Hidroalcohólico

EtOH: Etanol

GH: Grado de hidrólisis

HA-QJG: Hidrolizado con Alcalasa de la Quinoa Jacha Grano

HA-QRB: Hidrolizado con Alcalasa de la Quinoa Blanca Real

HF-QJG: Hidrolizado con Flavourzima de la Quinoa Jacha Grano

HF-QRB: Hidrolizado con Flavourzima de la Quinoa Blanca Real

HHL: Hipuril-histidil-leucina

His: Histidina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPLC-prep: High Performance Liquid Chromatography preparative

HTA: Hipertensión arterial

Met: Metionina

N: Nitrógeno

ppm: Partes por millón

QJG: Quinoa Jacha Grano

QRB: Quinoa Real Blanca

QRN: Quinoa Real Negra

QRR: Quinoa Real Roja

R²: Coeficiente de correlación

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Ser: Serina

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN	iii
ABREVIATURAS EMPLEADAS	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS GENERAL	xii
ÍNDICE DE FIGURAS PARTE I.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS PARTE II.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS GENERAL	xiv
ÍNDICE DE TABLAS PARTE I.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS PARTE II.....	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. La quinua, centro de origen y de diversidad	1
2. Descripción botánica de la quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).....	1
2.1. Clasificación Taxonómica.....	1
3. Aspectos nutricionales de la quinua.....	2
4. El cultivo de la quinua en Bolivia.....	3
4.1. Zonas de producción de quinua en Bolivia	4
4.1.1. Altiplano Norte.....	5
4.1.2. Altiplano Central.....	5
4.1.3. Altiplano Sur	6
4.1.4. Valles Interandinos.....	6
4.1.5. La quinua en la Puna	6
4.1.6. Llanos orientales	6
5. Variedades cultivadas de quinua.....	7
6. Producción y exportación de quinua en Bolivia	10
6.1. Países destino de las exportaciones de quinua	10
7. Alimentos funcionales	11
BIBLIOGRAFÍA	14
PARTE I.....	16

1.1. INTRODUCCIÓN	17
1.2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	18
1.2.1. Proteínas en la Quinoa.....	18
1.2.2. Métodos de purificación y separación de proteínas	19
1.2.2.1. Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio (SDS)	19
1.2.2.2. Electroforesis en gel unidimensional	19
1.2.2.3. Electroforesis en gel bidimensional	20
1.2.3. Hidrólisis de proteínas.....	20
1.2.4. Hidrólisis enzimática de Proteínas	20
1.2.4.1. Química del enlace peptídico	21
1.2.5. Proteasas.....	22
1.2.5.1. Clasificación de proteasas	24
1.2.5.1.1. Exopeptidasas.....	25
1.2.5.1.2. Endopeptidasas.....	26
1.2.6. Proteasa de <i>Bacillus licheniformes</i> , Subtilisin A (Alcalasa).....	27
1.2.6.1. Mecanismo catalítico de la serina proteasa	27
1.2.7. Proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (Flavourzima).....	29
1.2.8. Péptidos con actividad biológica.....	29
1.2.9. Actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina como control de la hipertensión	30
1.2.9.1. Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	30
1.2.9.2. Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	31
1.2.9.2.1. Clasificación de los inhibidores de ECA.....	31
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
1.4. PARTE EXPERIMENTAL	35
1.4.1. Materiales, equipos y reactivos	35
1.4.1.1. Materiales	35
1.4.1.2. Equipos.....	36
1.4.1.3. Reactivos	36
1.4.2. Muestras	37
1.4.2.1. Matriz	37

1.4.3. Análisis proximal de las dos variedades de harina de quinua	37
1.4.4. Extracción de proteínas de las dos variedades de quinua.....	38
1.4.4.1. Obtención de harina desengrasada de las variedades de Quinua	38
1.4.4.2. Extracción de proteína de quinua por precipitación isoelectrica.....	38
1.4.5. Hidrólisis Enzimática de la proteína extraída y determinación del grado de hidrólisis (GH) por el método pH-stat.....	39
1.4.6. Separación de las fracciones peptídicas mediante cromatografía de exclusión molecular.....	40
1.4.7. Determinación de la Actividad Antihipertensiva <i>in vitro</i> de los hidrolizados y fracciones peptídicas obtenidos a partir de las dos variedades de quinua.....	40
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.5.1. Análisis proximal de las dos variedades de harina de quinua	41
1.5.2. Extracción de proteínas de las dos variedades de quinua por precipitación isoelectrica.....	42
1.5.3. Determinación del grado de hidrólisis (GH) por método pH STAT.....	44
1.5.4. Evaluación de la Actividad Antihipertensiva <i>in vitro</i> de hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas obtenidos a partir de las dos variedades de quinua.....	46
1.6. CONCLUSIONES.....	49
1.7. RECOMENDACIONES.....	50
1.8. BIBLIOGRAFÍA.....	49
PARTE II.....	60
2.1. INTRODUCCIÓN	61
2.2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	62
2.2.1. Compuestos Fenólicos.....	62
2.2.2. Biosíntesis de Compuestos Fenólicos	63
2.2.3. Clasificación de los Compuestos fenólicos.....	64
2.2.3.1. Flavonoides	65
2.2.3.2. Compuestos Fenólicos que no son flavonoides.....	69
2.2.4. Compuestos Fenólicos en Cereales.....	72
2.2.5. Compuestos fenólicos en Quinua.....	74
2.2.5.1. Análogos del ácido benzoico en Quinua	75
2.2.5.2. Análogos del ácido cinámico en Quinua.....	76

2.2.5.3. Flavonas en Quinoa.....	78
2.2.5.4. Flavonoles en Quinoa.....	79
2.2.5.5. Flavanonas en Quinoa.....	83
2.2.5.6. Flavanoles en Quinoa.....	84
2.2.5.7. Isoflavonas en Quinoa.....	85
2.2.6. Actividad Antitirosinasa.....	86
2.2.6.1. Tirosinasa.....	89
2.2.6.2. Inhibidores de la Tirosinasa.....	90
2.2.7. Antioxidantes.....	91
2.2.7.1. Clasificación de los antioxidantes.....	92
2.2.7.2. Actividad antioxidante.....	89
2.2.8. Determinación del contenido de Compuesto Fenólicos Totales mediante el Método Folin-Ciocalteu.....	86
2.2.9. Método ABTS.....	87
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	93
2.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	93
2.4.1. Materiales, equipos y reactivos.....	93
2.4.1.1. Materiales.....	93
2.4.1.2. Equipos.....	94
2.4.1.3. Reactivos.....	95
2.4.2. Muestras.....	96
2.4.2.1. Matriz.....	96
2.4.3. Análisis Fitoquímico preliminar.....	97
2.4.4. Obtención de extractos.....	98
2.4.4.1. Obtención de harina desengrasada de las variedades de Quinoa.....	98
2.4.4.2. Extracto Hidroalcohólico (EHA) de las variedades de Quinoa.....	98
2.4.4.3. Fracciones Ricas en Compuestos Fenólicos de la variedad Quinoa Jacha Grano.....	99
2.4.5. Aislamiento del Flavonoide mayoritario.....	101
2.4.5.1. Separación de flavonoides por Cromatografía de Exclusión Molecular.....	101
2.4.5.2. Aislamiento del Flavonoide por HPLC preparativa.....	101

2.4.6. Identificación del Flavonoide aislado por espectroscopia de RMN.....	102
2.4.7. Cuantificación del Mauritianin.....	103
2.4.7.1. Curva de calibración del compuesto mauritianin.....	103
2.4.7.2. Cuantificación del compuesto mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinua y las fracciones ricas en compuestos fenólicos.....	105
2.4.8. Determinación de la Actividad Antitirosinasa <i>in vitro</i> de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	106
2.4.9. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	106
2.4.10. Determinación de la Actividad Antioxidante por el método ABTS de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	108
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
2.5.1. Análisis fitoquímico preliminar.....	109
2.5.2. Obtención de extractos.....	110
2.5.2.1. Extracto Hidroalcohólico (EHA) de las variedades de Quinua.....	110
2.5.2.2. Fracciones Ricas en Compuestos Fenólicos de la variedad Quinua Jacha Grano.....	110
2.5.3. Aislamiento del Flavonoide mayoritario.....	111
2.5.3.1. Separación del flavonoide por cromatografía de exclusión molecular.....	111
2.5.3.2. Aislamiento del Flavonoide por HPLC preparativa.....	112
2.5.4. Identificación del Flavonoide aislado.....	113
2.5.5. Cuantificación del compuesto mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinua y las fracciones ricas en compuestos fenólicos.....	116
2.5.6. Evaluación de la Actividad Antitirosinasa <i>in vitro</i> de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	117
2.5.7. Evaluación del Contenido Fenólico Total (Folin-Ciocalteu) y la Actividad Antioxidante (ABTS) <i>in vitro</i> de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	119
2.6. CONCLUSIONES.....	120
2.7. RECOMENDACIONES.....	121
2.8. BIBLIOGRAFÍA.....	121

ANEXOS

ARTICULOS

ÍNDICE DE FIGURAS GENERAL

Figura 1. Zonas de producción de quinua en Bolivia.....	5
Figura 2. Diversidad de variedades de quinua.....	7
Figura 3. Producción y exportaciones de quinua.....	10
Figura 4. Países destino de las exportaciones de quinua.....	10
Figura 5. Producción de quinua de Bolivia-Año agrícola 2005-2017.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS PARTE I

Figura 1.1. Estructura del subtilisin nativo. Se indican las ubicaciones relativas de los sitios catalíticos.....	27
Figura 1.2. Mecanismo de reacción de la serina proteasa.....	28
Figura 1.3. Sitios de actividad de la enzima convertidora de Angiotensina. (a) Organización de la proteína ACE. Los sitios activos, ubicados entre $\alpha 13$ y $\alpha 14$ de la ECA, se indican mediante un rectángulo negro. (b) Motivo de unión al zinc. Los residuos que rodean al Zn^{2+} están representados por palos rosados. (c) La interacción del enlace de hidrógeno entre Zn^{2+} y los residuos clave. La distancia entre los residuos clave y el zinc se muestra un ligplot ..	31
Figura 1.4. Comercialmente, los fármacos inhibidores más exitosos para la enzima convertidora de Angiotensina (ECA).....	32
Figura 1.5. Diseño de los inhibidores de la ECA desarrollados a partir de la interacción hipotética del sustrato Angiotensina I con la ECA.....	32
Figura 1.6. Mecanismo de acción de la inhibición de la enzima convertidora de la antiotensina I (modificado de Keidar y col., 2007).....	34
Figura 1.7. Precipitación de las proteínas de las dos variedades: a) Quinua Jacha Grano (QJG), b) Quinua Real Blanca (QRB).....	43
Figura 1.8. Grado de hidrólisis con la enzima Alcalasa para las dos variedades de quinua (QBR y QJG).....	45
Figura 1.9. Grado de hidrólisis con la enzima Flavourzyme para las dos variedades de quinua.....	45
Figura 1.10. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de los hidrolizados con la Alcalasa y la Flavourzyme para las dos variedades de quinua.....	46
Figura 1.11. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de las fracciones peptídicas a partir de los hidrolizados con la Alcalasa y la Flavourzyme para las dos variedades de quinua.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS PARTE II

Figura 2.1. Estructura de seis fenoles simples.....	63
Figura 2.2. Origen biosintético de fenoles de plantas de las vías del shikimato y fenilalanina	64
Figura 2.3. Clasificación de los compuestos fenólicos.....	64
Figura 2.4. Estructuras genéricas de los principales flavonoides	65
Figura 2.5. Estructura química básica de los flavonoles	67
Figura 2.6. Estructura química básica de las antocianidinas	67
Figura 2.7. Estructura química básica de los flavan-3-oles.....	68
Figura 2.8. Estructura química básica de las flavonas.....	68
Figura 2.9. Estructura química básica de las flavanonas.....	69
Figura 2.10. Estructura química básica de las isoflavanonas	69
Figura 2.11. Estructuras de los análogos del ácido benzoico aislados de la quinua.....	74
Figura 2.12. Estructuras de los análogos del ácido cinámico aislados de la quinua	76
Figura 2.13. Estructuras de las flavonas aisladas de la quinua.....	78
Figura 2.14. Estructuras de los flavonoles aislados de la quinua	80
Figura 2.15. Estructuras de las flavanonas aisladas de la quinua.....	82
Figura 2.16. Estructuras de los flavanoles aislados de la quinua	83
Figura 2.17. Estructuras de las isoflavanoides aislados de la quinua.....	84
Figura 2.18. Esquema de clasificación de los antioxidantes	88
Figura 2.19. a) Sitios de unión con metales de los flavonoides, b) Potencial antioxidante de los fenólicos.....	89
Figura 2.20. Reacciones específicas del reactivo de Folin-Ciocalteu con compuestos fenólicos: A. entre ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y compuestos fenólicos; B. entre ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) y compuestos fenólicos.	90
Figura 2.21. Radical ABTS (azul) abstrayendo H^+ de ABTS(H) (incolore).....	92
Figura 2.22. A) Estructura terciaria de la tirosinasa; B) Sitio activo de la tirosinasa	86
Figura 2.23. Esquema del análisis fitoquímico preliminar para determinar cualitativamente grupos de metabolitos.....	96
Figura 2.24. Proceso del desengrasado de las variedades de quinua.....	97
Figura 2.25. Proceso para la obtención de los extractos hidroalcohólicos y extractos ricos en compuestos fenólicos.....	99
Figura 2.26. Proceso de la separación de flavonoides por Sephadex LH-20	101
Figura 2.27. Cromatograma de las fracciones obtenidas por HPLC preparativa	102
Figura 2.28. Cromatograma HPLC-DAD del mauritianin a 360 nm aun tiempo de retención de 19.8 min.	104
Figura 2.29. Curva de calibración del mauritianin	104
Figura 2.30. Cromatogramas HPLC-DAD de los 4 extractos hidroalcohólicos a 360 nm: A. EHA-QBR;	105

Figura 2.31. Curva de calibración del Ácido gálico.....	107
Figura 2.32. Curva de calibración del Trolox.....	108
Figura 2.33. Placa TLC de las cuatro extracciones: 1) AEA-1; 2) AEA-2; 3) AEA-3; 4) AEA-4	111
Figura 2.34. Placas TLC de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular: 1) Fracción I (No flavonoides); 2) Fracción II (Concentrado de flavonoides). 112	
Figura 2.35. Cromatograma obtenido en el HPLC preparativo de la Fracción rica en flavonoides y placas TLC de las fracciones de interés.....	112
Figura 2.36. Flavonoide aislado y sus placas TLC.....	113
Figura 2.37. Estructura del Mauritianin.....	114

ÍNDICE DE TABLAS GENERAL

Tabla 1. Taxonomía de la quinua	2
Tabla 2. Valores máximos y mínimos de compuestos del grano de quinua (g/100g)	2
Tabla 3. Contenido de lisina, metionina, treonina y triptófano en granos andinos y en trigo (mg de.....)	3
Tabla 4. Variedades de quinua de Bolivia obtenidas mediante mejoramiento genético	8
Tabla 5. Variedades nativas de Quinua Real del altiplano sur, purificadas mediante selección masal.....	9

ÍNDICE DE TABLAS PARTE I

Tabla 1.1. Propiedades y técnicas de separación de proteínas	19
Tabla 1.2. Relación nitrógeno amino / nitrógeno total para diferentes secuencias peptídicas	21
Tabla 1.3. Tipos de Proteasas Comerciales	23
Tabla 1.4. Tipos de Proteasas y su modo de acción	25
Tabla 1.5. Resumen de las referencias de las muestras estudiadas	37
Tabla 1.6. Métodos para análisis proximal	38
Tabla 1.7. Resumen de las referencias de las muestras hidrolizadas con la enzima Alcalasa y la Flavourzima, para las dos variedades de quinua	39
Tabla 1.8. Resultados del Análisis Proximal para las dos variedades de quinua	42
Tabla 1.9. Rendimiento de proteína extraída en las dos variedades de quinua	49
Tabla 1.10. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de los hidrolizados con la Alcalasa y la Flavourzyme para las dos variedades de quinua	46

ÍNDICE DE TABLAS PARTE II

Tabla 2.1. Las principales fuentes dietéticas de flavonoides.....	66
Tabla 2.2. Ácidos fenólicos reportados en granos de cereales	72
Tabla 2.3. Flavonoides reportados en granos de cereales.....	72
Tabla 2.4. Análogos del ácido benzoico y sus actividades o funciones biológicas.....	75
Tabla 2.5. Análogos del ácido cinámico y sus actividades o funciones biológicas.....	77
Tabla 2.6. Flavonas y sus actividades o funciones biológicas.....	78
Tabla 2.7. Flavonoles y sus actividades o funciones biológicas.....	81
Tabla 2.8. Flavanonas y sus actividades biológicas	84
Tabla 2.9. Flavonoles y sus actividades o funciones biológicas.....	85
Tabla 2.10. Isoflavonas y sus actividades o funciones biológicas.....	86
Tabla 2.11. Resumen de las referencias de las muestras estudiadas	95
Tabla 2.12. Resumen de referencias de las harinas de quinua.....	96
Tabla 2.13. Resumen de las referencias de los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinua	97
Tabla 2.14. Resumen de las referencias las fracciones ricas en compuestos fenólicos.....	99
Tabla 2.15. Estudio fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de la Quinua Jacha Grano	109
Tabla 2.16. Rendimiento de las extracciones hidroalcohólicas para las dos variedades de quinua	110
Tabla 2.17. Rendimiento de las extracciones a partir del extracto hidroalcohólico (24 horas) de la variedad QJG	111
Tabla 2.18. Pesos de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular	112
Tabla 2.19. Desplazamientos de ¹³ C-RMN del Mauritianin.....	115
Tabla 2.20. Contenido del mauritianin en granos de quinua, extractos y fracciones ricas en compuestos fenólicos.....	116
Tabla 2.21. Porcentaje de Inhibición de la Tirosinasa, de los extractos, fracciones y del mauritianin.....	117
Tabla 2.22. Cuantificación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en extractos, fracciones y mauritianin.....	119

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La quinua, centro de origen y de diversidad

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un pseudo-cereal, es un alimento ancestral de los Andes Sudamericanos y a pesar de ser reconocida como un cultivo de altura, posee una amplia variabilidad genética, encontrándose en diversas zonas agroecológicas de la región y ligada a diversos sistemas productivos, estuvo confinada a los países andinos, siendo Bolivia y Perú los principales productores. Sin embargo, su cultivo se expandió a Norteamérica y Europa primero, y luego al resto del mundo. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

La quinua fue catalogada por la FAO como uno de los cultivos promisorios de la humanidad, no sólo por sus grandes propiedades benéficas y sus múltiples usos, sino también por considerarla como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana. (FAO & PROINPA, 2011)

2. Descripción botánica de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

El nombre científico de la quinua es *Chenopodium quinoa* Willd, que incluye la abreviatura botánica correspondiente a **Carl Ludwig Willdenow**. Botánicamente, la quinua pertenece al **Género** *Chenopodium*, **Clase** – Dicotiledóneas y **familia** – Chenopodiáceas.

Las plantas de quinua silvestre, que tienen una distribución mundial, son aquellas que se han desarrollado sin intervención humana y tienen genes valiosos. La quinua silvestre constituye un potencial genético que puede ser explotado para el desarrollo de variedades en el futuro en varias partes del planeta. Algunos taxones y poblaciones se caracterizan por tolerar y resistir las plagas de insectos y enfermedades, heladas y sequías, y también poseen rasgos favorables en términos de valor nutricional y la duración del ciclo productivo. (Singh, 2019)

2.1. Clasificación Taxonómica

La clasificación de la quinua se realizó primero según el color de la planta y los frutos. Posteriormente, se basó en los tipos morfológicos de la planta. A pesar de la gran variación observada, la quinua es considerada como una sola especie. (Singh, 2019)

La clasificación botánica de las especies cultivadas de *Chenopodium* ha sido descrita por Cronquist 1995 y Wilson 1980 y clasificaron la quinua taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 1.)

Tabla 1. Taxonomía de la quinua

Reyno:	Vegetal
División:	Fenerogamas
Clase:	Dicotiledóneas
Subclase:	Angiospermas
Orden:	Centrospermales
Familia:	Chenopodiáceas
Género:	Chenopodium
Sección:	Chenopodia
Subsección:	Cellulata
Especie:	<i>Chenopodium quinoa Willd</i>

Fuente: Risi, Rojas, & Pacheco, 2015

Su período vegetativo varía desde los 90 hasta los 240 días, crece con precipitaciones desde 200 a 2600 mm anuales, se adapta a suelos ácidos de pH 4.5 hasta alcalinos con pH de 9.0, sus semillas germinan hasta con 56 mmhos/cm de concentración salina, se adapta a diferentes tipos de suelos desde los arenosos hasta los arcillosos, la coloración de la planta es también variable con los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillento, anaranjado, granate y demás gamas que se pueden diferenciar. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

3. Aspectos nutricionales de la quinua

La quinua ha adquirido importancia internacional por ser rico en proteínas y llevar en su composición todos los aminoácidos esenciales para la nutrición del ser humano, además posee vitaminas (B1, B2, B3 y C) y minerales (calcio y hierro). El contenido de proteínas varía entre 12 y 16%, aunque hay reportes de valores cercanos al 20%. (ONUUDI, 2006)

Tabla 2. Valores máximos y mínimos de compuestos del grano de quinua (g/100g)

Compuesto	Rango Mínimo-Máximo	Variación
Proteínas	11.0 - 21.3	10.3
Grasas	5.3 - 8.4	3.1
Carbohidratos	53.5 - 74.3	20.8
Fibra	2.1 - 4.9	2.8
Ceniza	3.0 - 3.6	0.6
Humedad	9.4 - 13.4	4.0

Fuente: ONUUDI, 2006

En la Tabla 2., se ve que el contenido de proteína en la quinua tiene una variación de 10.3 %, lo cual es menor a los reportados por otros autores. Sin embargo, los datos obtenidos no especifican el tipo de material empleado para los análisis, probablemente se trate de quinua desaponificada por vía seca que pudo haber provocado pérdidas parciales del embrión y consecuentemente la reducción del contenido de proteínas. Otro aspecto que pudo haber influido es las condiciones de fertilidad del suelo donde se ha cultivado la quinua.

Las proteínas de los granos andinos difieren del contenido en los cereales no sólo en cantidad, sino también en calidad representada por la presencia balanceada de aminoácidos esenciales. (ONUUDI, 2006)

El contenido de los principales aminoácidos limitantes es claramente mayor en la quinua frente al del trigo (Tabla 3.).

Tabla 3. Contenido de lisina, metionina, treonina y triptófano en granos andinos y en trigo (mg de aminoácidos/g de proteínas)

Aminoácidos	Quinua (mg)	Cañahua (mg)	Amaranto (mg)	Trigo (mg)
Lisina	68	59	67	29
Metionina	21	16	23	15
Treonina	45	47	51	29
Triptófano	13	8	11	11

Fuente: ONUUDI, 2006

4. El cultivo de la quinua en Bolivia

En Bolivia, la quinua mantuvo su importancia como un cultivo de autoconsumo en el altiplano y en las partes altas de los valles, distinguiéndose la diferencia entre las variedades nativas de altiplano con planta de tamaño menor y las quinuas de valles de mayor tamaño de planta, pero con grano más pequeño. Se debe mencionar que, si bien la quinua era un cultivo y alimento conocido por los pobladores de Bolivia, se hicieron esporádicos trabajos de descripción taxonómica y de la calidad nutricional del grano a partir de la década de 1940. No es hasta 1965 que se inician trabajos sistemáticos de investigación, existiendo dos períodos muy claros: hasta 1997 hubo una fuerte participación del Estado con recursos a través de proyectos financiados por la cooperación internacional; y a partir de 1997 en que la investigación es liderada por fundaciones y universidades. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1. Zonas de producción de quinua en Bolivia

Es importante hacer notar que, como consecuencia de la coyuntura actual de un gran valor económico de la quinua, mercados insatisfechos y una agresiva promoción del gobierno boliviano, ha generado gran interés de cultivar quinua en todas las zonas de Bolivia.

La principal zona de producción en el país es el altiplano, particularmente el altiplano sur, donde se cultivan grandes extensiones destinadas a la exportación y donde sus condiciones agroecológicas no es posible desarrollar otro cultivo. La zona más importante de expansión del cultivo es el altiplano central, mientras que en el altiplano norte las superficies son de menor extensión y mayor diversidad de cultivos. Otras zonas importantes de expansión son los valles interandinos, donde los suelos son más fértiles y se obtienen mejores rendimientos; sin embargo, es muy difícil lograr cultivos orgánicos. Las zonas nuevas de interés de cultivo son la Puna semi-árida y árida según clasificación de Liberman (1992) e Ibisch y Mérida (2003) y los llanos orientales, donde se pretende adaptar variedades para los cultivos de invierno que puedan entrar en rotación con la soya.

Gandarillas (1982), ha zonificado las zonas de producción de quinua en base a las características del suelo, régimen de los factores del clima, y la posibilidad de producción ganadera y agrícola. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

A continuación, se realiza una descripción de las zonas productoras de quinua en Bolivia (Figura 1.) y de las variedades predominantes para cada una de ellas.

- Altiplano norte
- Altiplano central
- Altiplano sur
- Valles interandinos
- Puna
- Llanos orientales

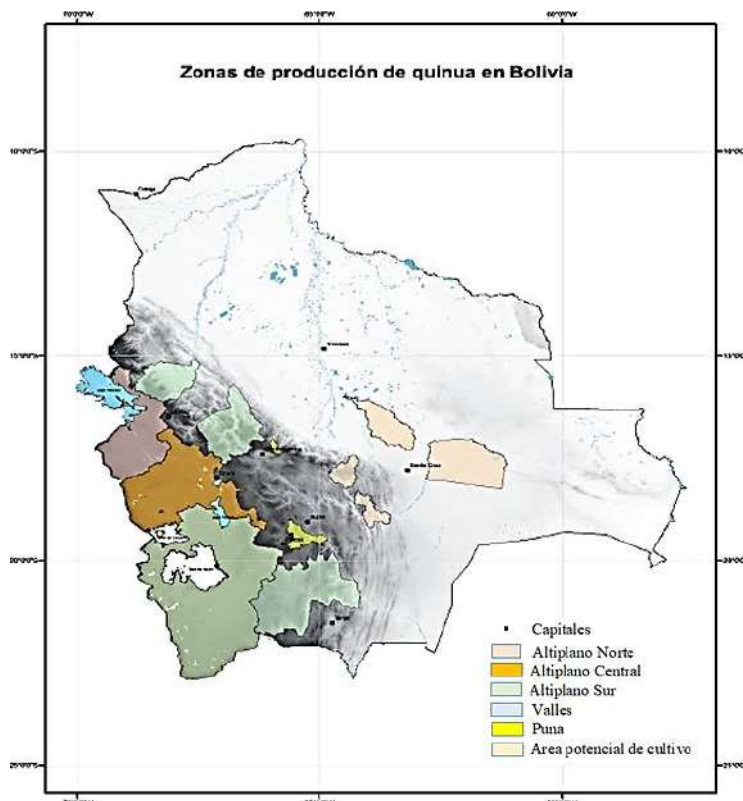


Figura 1. Zonas de producción de quinua en Bolivia

Fuente: Risi et al., 2015

4.1.1. Altiplano Norte

Las variedades mejoradas que se adaptan a las condiciones del altiplano norte son Kurmi, Blanquita y Jacha Grano. Entre las variedades nativas se destacan Phisanqalla y Janqu Jupa. Al ser esta zona relativamente más húmeda que las otras, se presenta el mildiu, por lo que las variedades que se cultivan deben tener algún grado de resistencia a esta enfermedad. Además, si se cultiva para comercializar en el mercado, el tamaño de grano debe ser igual o mayor a 2.0 mm. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1.2. Altiplano Central

Las variedades mejoradas adaptadas al altiplano central son Sajama, Chucapaca, Jacha Grano, Horizontes, Aynuqa Waranqa, Kamiri, Sayaña, Patacamaya, Surumi, Intinaira, Santa Maria, Jumataki, Jilata, Samaranti, Amilda y Robura. Estas variedades son adaptadas a la zona por tener ciclo intermedio, grano mediano a grande. Cuando se introducen a otras zonas como el altiplano sur, presentan problemas de adaptación alargándose el ciclo productivo. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1.3. Altiplano Sur

Las variedades mejoradas para el altiplano sur son Qusuña y Horizontes. Las variedades seleccionadas son Mañiqueña y Qanchis Blanca; además se cultivan más de 20 variedades locales, aunque las preferidas son la Real Blanca, Chaku, Pandela, Toledo y Phisanqalla. Cuando estas variedades se trasladan a otras zonas como el centro y norte de mayor precipitación y más húmedas, son severamente atacadas por el mildiu. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1.4. Valles Interandinos

La zona de los valles interandinos se extiende a los departamentos de La Paz, Cochabamba, Potosí, Chuquisaca y Tarija.

La quinua se cultiva tradicionalmente en todos los valles como cerco a los cultivos de maíz y papa. Sin embargo, en los últimos años existe mayor interés, se tiene referencia de que productores del Valle Alto de Cochabamba han producido quinua con éxito empleando variedades mejoradas como Kurmi, Blanquita y Jacha Grano. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1.5. La quinua en la Puna

En los tres últimos ciclos agrícolas (2010-2013), se evaluó de manera participativa el comportamiento de siete variedades de quinua en varias zonas de Puna de Tarija. Las variedades de mejor performance fueron Sajama, K'ellu y Pasancalla, con rendimientos superiores a los 950 kg/ha. Estos resultados muestran la capacidad de adaptación de la quinua a estas zonas que, para su mayor expansión, requiere el desarrollo de técnicas del cultivo de acuerdo a las condiciones propias del lugar. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

4.1.6. Llanos orientales

Desde hace aproximadamente cinco años, ANAPO (Asociación Nacional de Productores de Oleaginosas y Trigo), ha mostrado interés por la introducción de quinua en la zona tropical de Bolivia. Están conduciendo las primeras evaluaciones de quinua en siembras de invierno en estas zonas, lo que se ha venido a llamar la tropicalización de la quinua. Se están evaluando principalmente variedades de valle, los primeros resultados muestran evidencias de variaciones morfológicas y genéticas debido al estrés por las altas temperaturas; sin embargo, ha sido posible obtener grano y cosechar semilla. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

5. Variedades cultivadas de quinua

Se entiende por variedad a una población de plantas que por características comunes se diferencia de otra población de plantas de la misma especie. Las variedades de quinua que se utilizan tienen, en términos generales, dos orígenes: algunas son resultado de un proceso de selección por parte de los agricultores y han sido utilizadas desde el inicio de la agricultura, y otras son productos de los programas de investigación y mejoramiento genético descritos en los puntos anteriores. Existen muchos términos para describir a estas poblaciones de plantas, y con el fin de facilitar el trabajo y la explicación a lo largo de este documento se usarán dos definiciones para describir las variedades de quinua. Aquellas variedades que son producto de la selección por parte de agricultores han sido llamadas **variedades nativas**, en otros textos también se les puede llamar: variedades, razas, ecotipos o morfotipos. Por otro lado, aquellas variedades que son obtenidas por procesos de mejoramiento genético han sido llamadas **variedades mejoradas**, y en otros textos se les puede llamar cultivares o variedades. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)



Figura 2. Diversidad de variedades de quinua
Fuente: Risi *et al.*, 2015

Existen variedades nativas y mejoradas de quinua adaptadas a condiciones diversas. Algunas se cultivan en regiones de precipitación escasa, como el altiplano sur, sugiriendo la resistencia a sequías, sin embargo, estas son susceptibles al mildiu cuando se cultivan en zonas del altiplano centro y norte. Por otro lado, se observan cultivos en áreas donde los niveles de precipitación son mayores, por ejemplo: Morochata y Mizque en Cochabamba, Tarabuco en Chuquisaca e Iscayachi en Tarija, donde la precipitación pasa los 800 mm al año, lo que sugiere resistencia al mildiu.

En el país son 22 las variedades mejoradas de quinua, es decir aquellas obtenidas por mejoramiento genético a través de hibridaciones o selección. En la Tabla 4., se presenta el nombre de la variedad, el año de su lanzamiento y al menos dos variables morfológicas y agronómicas que las caracterizan. (Risi, Rojas, & Pacheco, 2015)

Tabla 4. Variedades de quinua de Bolivia obtenidas mediante mejoramiento genético

N°	Variedad	Año	Características morfológicas		Características Agronómicas	
			Color de planta	Color de grano	Altura de la planta (cm)	Tolerancia
1	Sajama	1967	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	110	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
2	Samaranti	1982	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	120	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
3	Huaranga	1982	Verde	Blanco	97	Susceptible a heladas y mildiu
4	Kamiri	1986	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	120	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
5	Chucapaca	1986	Rojo	Blanco calcáreo	130	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
6	Sayaña	1992	Anaranjado	Amarillo	110	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
7	Ratuqui	1993	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	90	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
8	Robura	1994	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	120	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
9	Jiskitu	1994	Amarillo	Crema suave	110	Buena tolerancia a heladas y mildiu
10	Amilda	1994	Amarillo	Crema suave	113	Buena tolerancia a heladas y mildiu
11	Santa María	1996	Amarillo	Blanco terroso	100	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
12	Intinaira	1996	Anaranjado	Amarillo intenso	110	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
13	Surumi	1996	Rosado	Rosado leve	130	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
14	Jilata	1996	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	110	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
15	Jumataqui	1996	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	106	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
16	Patacamaya	1996	Amarillo pálido	Blanco calcáreo	100	Heladas (-5°C) Mediana a sequía
17	J'acha Grano	2003	Verde amarillento	Blanco	120	Resistencia parcial al mildiu
18	Kosuña	2005	Amarillo pálido	Blanco	110	Tolerancia media a sequía, helada, granizo
19	Kurmi	2005	Amarillo opaco	Blanco	120	Resistente al mildiu, susceptible a heladas

20	Horizontes	2007	Amarillo opaco	Crema	120	Tolerancia moderada a sequía, helada, granizo
21	Aynoka	2007	Amarillenta	Blanco intenso	100	Susceptible a mildiu
22	Blanquita	2007	Amarillo blanquecino	Blanco intenso	120	Resistente al mildiu, tolerante a granizo

Fuente: Risi, *et al.*, 2015

Asimismo, se cuenta con un complejo importante de variedades nativas conocidas como Quinoa Real que son propias del altiplano sur y que incluye a varias razas locales o ecotipos locales. Los agricultores del altiplano sur acostumbraban a utilizar una diversidad de ecotipos locales de Quinoa Real, ante esta situación, desde el año 1993 en el marco del Programa Quinoa del IBTA se identificaron mediante purificación 13 ecotipos (Tabla 5.), mediante el método de selección masal estratificada, habiéndose purificado 13 variedades nativas, con este proceso se inició la producción de parcelas por ecotipo de quinoa.

Tabla 5. Variedades nativas de Quinoa Real del altiplano sur, purificadas mediante selección masal

N°	Variedad	Características morfológicas		Características Agronómicas	
		Color de planta	Color de grano	Altura de la planta (cm)	Tolerancia
1	Real Blanca	Amarillo claro	Blanco	105	Heladas
2	Toledo	Naranja oscuro	Naranja	120	Ticonas
3	Utusaya	Rosado claro	Blanco	73	Heladas
4	Rosa Blanca	Rojo oscuro	Blanco	134	
5	Q'illu	Amarillo oscuro	Amarillo	95	Heladas
6	Pandela	Rosado claro	Rosado	90	Heladas
7	Chullpi	Amarillo claro	Chillpi	75	Polilla
8	Achachino	Rojo oscuro	Rojo	125	Heladas
9	Manzana	Rojo oscuro	Rojo	110	Desgrane
10	Toledo Amarilla	Naranja	Amarillo	90	Heladas
11	Real Blanca	Amarillo claro	Blanco	90	Heladas
12	Real Elba	Amarillo Claro	Blanco	80	Heladas
13	Rosada	Rosado	Rosado	80	Heladas

Fuente: Risi *et al.*, 2015

6. Producción y exportación de quinua en Bolivia

Entre el 2005 y 2015 las exportaciones de quinua acumularon 946 millones de dólares en términos de valor, y 285 mil toneladas en volumen, registrándose el pico más alto en el 2014. Al tercer trimestre del 2016, se registró un crecimiento del 8% en volumen, mientras que el valor disminuyó en un 33% respecto al mismo período del 2015.

55% de las exportaciones bolivianas de quinua hasta septiembre del 2016, tuvieron como destino a Estados Unidos, y 33% del total de las importaciones de quinua del mundo fueron de origen boliviano, durante la gestión 2015. (<https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>, s.f.)

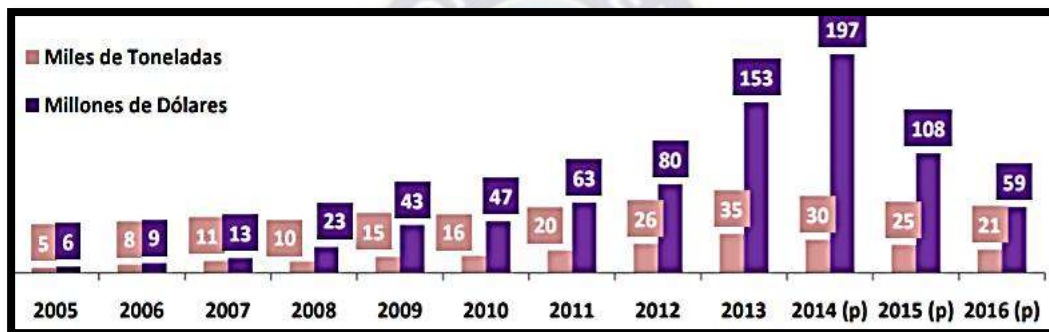


Figura 3. Producción y exportaciones de quinua
Fuente: <https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>, s.f

6.1. Países destino de las exportaciones de quinua

Bolivia logró exportar más de 35 mil toneladas de quinua en el 2013, y llegó a percibir 197 millones de dólares por la venta de este grano en el 2014, para luego descender tanto en volumen y valor exportado. EEUU es el principal comprador de quinua boliviana. (<https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>, s.f.)

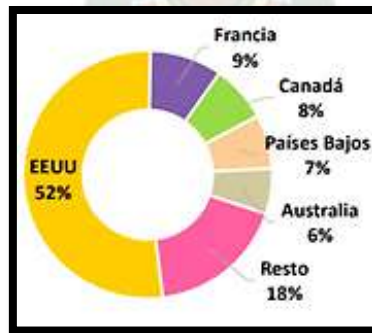


Figure 4. Países destino de las exportaciones de quinua
Fuente: <https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>, s.f

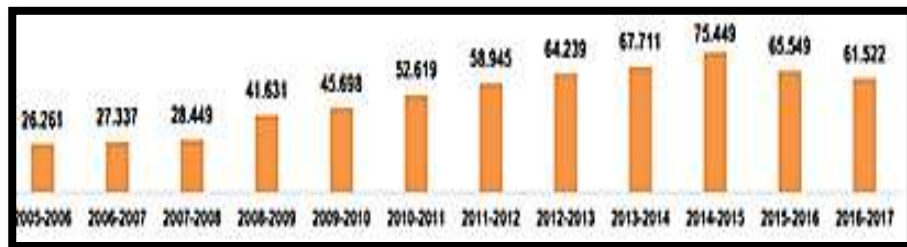


Figura 5. Producción de quinua en Bolivia -Año agrícola 2005-2017
Fuente: <https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>, s.f

7. Alimentos funcionales

En las últimas décadas, el concepto de alimentos funcionales ha ofrecido un enfoque nuevo y práctico para lograr una salud óptima al promover el uso de productos naturales con beneficios fisiológicos, reduciendo así el riesgo de diversas enfermedades crónicas. La mayoría de los alimentos funcionales y agentes terapéuticos disponibles en la actualidad se derivan directa o indirectamente de fuentes naturales, especialmente las plantas y especies marinas. (Boardbar, Anwar, & Saari, 2011)

El interés en el desarrollo de alimentos funcionales es próspero, impulsado en gran medida por el potencial de mercado de alimentos que pueden mejorar la salud y el bienestar de los consumidores. El concepto de alimentos funcionales, incluye alimentos o ingredientes alimentarios que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud y/o reducen el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas.

Se introdujo en el mercado tipos de productos funcionales exitosos que han sido diseñados para reducir la presión arterial alta, el colesterol, el azúcar en la sangre y la osteoporosis. (Charalampopoulos, Wang, Pandiella, & Webb, 2002)

Los seres humanos actualmente obtienen del 30% al 70% de su energía diaria de los alimentos a base de cereales, lo que indica que la innovación de los granos o alimentos funcionales similares a los granos desempeña un papel de “puerta de entrada” en la conversión de los cultivos agrícolas a consumibles.

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cultivo alimenticio similar al grano que ha proporcionado nutrición y sustento a las culturas indígenas andinas durante miles de años y ahora juega un papel cada vez más importante en las dietas humanas en todo el mundo. La quinua ha sido promovida como un cultivo agrícola alternativo debido a sus características

tolerantes al estrés y se comercializa como un “superalimento” por sus cualidades nutritivas. Recientemente ha surgido una gran cantidad de investigaciones sobre los componentes químicos y las propiedades terapéuticas de la quinua, que representan el cultivo como un recurso importante para el desarrollo funcional de los alimentos.

Dentro de los sectores de alimentos funcionales, suplementos botánicos, cosméticos y farmacéuticos, se han desarrollado tecnologías basadas en la quinua para apuntar a las siguientes áreas terapéuticas de la salud humana: (1) enfermedad celíaca, (2) rendimiento deportivo y mejora de la forma física, (3) pérdida de peso y/o parámetros metabólicos asociados con diabetes, obesidad, hipertensión, hiperlipidemia y posmenopausia, (4) cuidado de la piel y el cabello, y (5) absorción de drogas. (Graf, et al., 2015)

En la actualidad, los péptidos obtenidos tanto de fuentes animales como vegetales y algunos sintetizados químicamente, han sido identificados como “alimentos funcionales” si éstos presentan alguna actividad biológica. (Silveira & Monereo, 2003). Algunas actividades biológicas que pueden presentar las proteínas alimenticias y sus péptidos son: actividad antioxidante, antitumoral, antitrombótica, antibacteriana e inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina. (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008)

En los últimos años, el papel de las proteínas en la dieta como componentes fisiológicamente activos ha sido cada vez más reconocido. Dichas proteínas o sus precursores pueden aparecer naturalmente en materias primas alimenticias que ejercen su acción fisiológica directa o tras hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo*. En este contexto, ha quedado claro que las proteínas de la dieta son una fuente de péptidos biológicamente activos. Estos péptidos están inactivos dentro de la secuencia de la proteína original y pueden liberarse durante la digestión gastrointestinal o el procesamiento de alimentos. Una vez que los péptidos bioactivos se liberan, pueden causar diferentes funciones fisiológicas. (Korhonen & Pihlanto, Bioactive peptides: Production and functionality, 2006)

Algunos alimentos funcionales pueden contener péptidos bioactivos obtenidos vía hidrólisis enzimática de proteínas, estos péptidos tienen la capacidad de mejorar la bio-disponibilidad de las proteínas propiciando un efecto benéfico al consumirlos, ya sea a través de los mismos productos o “creando” nuevos a través de la adición o fortificación de péptidos. Éste tipo de

procedimientos se ha reportado para productos de origen animal, en especial para el grupo de los lácteos (Dziuba & Darewics, 2007; Figueroa-Hernández, *et al.*, 2007)

El aumento del interés en los polifenoles en la última década ha sido provocado por los resultados de estudios epidemiológicos con un menor riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Los compuestos fenólicos se distribuyen ubicuamente en todo el reino vegetal. Cada vez hay más pruebas de ensayos epidemiológicos, *in vivo*, *in vitro* y clínicos que sugieren claramente que los compuestos fenólicos presentes en frutas, verduras y granos pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, antiinflamatorios, cardiovasculares y neurodegenerativos. (Luthria & Mukhopadhyay, 2006; Alvarez-Jubete, *et al.*, 2009)

A partir de los antecedentes presentados, el trabajo de investigación se divide en dos partes, teniendo como **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar las cualidades funcionales de variedades bolivianas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) a través de la determinación de la actividad antihipertensiva *in vitro* de hidrolizados enzimáticos y fracciones peptídicas, así como la determinación del contenido fenólico total, la actividad antitirosinasa y antioxidante *in vitro* de extractos, fracciones ricas en compuestos fenólicos y del compuesto aislado.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Jubete, L., Auty, M. A., & Gallagher, E. (2009). Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, 230(3), 437-445.

Boardbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761-1805.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 131-141.

Dziuba, M., & Darewicz, M. (2007). Food proteins as precursors of bioactive peptides—classification into families. *Food science and technology international*, 13(6), 393-404.

FAO, & PROINPA. (2011). *La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial*. La Paz-Bolivia.

Figueroa-Hernández, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Calcium and iron binding peptides production by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NCFB 712. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 259-267.

Gandarillas, A., Rojas, W., Bonifacio, A., & Ojeda, N. (2013). La Quinoa en Bolivia: Perspectiva de la Fundación PROINPA. *FAO-RLC*.

Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 431-445.

<https://ibce.org.bo/publicaciones-ibcecifras-pdf.php?id=502>. (s.f.).

Ibish, P. L., & Mérida, G. (2003). *Biodiversidad: La riqueza de Bolivia*. Estado. Santa Cruz, Bolivia: FAN.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.

Liberman, M. (1992). Ecosistemas de Bolivia. El agroecosistema andino. *Taller Internacional sobre el Agrosistema Andino*, (págs. 109-118). Lima, Perú

Luthria, D., & Mukhopadhyay, S. (2006). Influence of Sample Preparation on Assay of Phenolic Acids from Eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 41-47.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.

ONUDI, I. (2006). *Granos en el Área Altoandina de Bolivia, Ecuador y Perú*.

Risi, J., Rojas, W., & Pacheco, M. y. (2015). *Producción y mercado de la quinua en Bolivia*. La Paz-Bolivia.

Silveira, M., & Monereo, S. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*, 77(3), 317-331.

Singh, D. (2019). *Quinoa (Chenopodium Quinoa Willd)*. India: Scientific Publishers.



PARTE I

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA *IN VITRO* DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS Y FRACCIONES PEPTÍDICAS DE DOS VARIETADES DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)



1.1. INTRODUCCIÓN

El incremento del número de casos de síndrome metabólico es una de las causas de la expansión de la epidemia mundial de diabetes tipo II y de enfermedades cardiovasculares (Dunstan, et al., 2002). El síndrome metabólico tiene una prevalencia en la población mundial del 25%, dicha población tiene una probabilidad tres veces mayor de sufrir un ataque cardíaco o un accidente cerebrovascular y dos veces mayor de morir por tales causas (Isomas, Almgren, & Tuomi, 2001). En este sentido, la hipertensión arterial (HTA) es considerada actualmente como la enfermedad crónica más frecuente del mundo. Entre los fármacos antihipertensivos más utilizados se encuentran los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA), los cuales reducen la formación del vasoconstrictor Angiotensina II (Hirsch, 2003). Sin embargo, los inhibidores sintéticos de la ECA, como el captopril, tienen multitud de efectos secundarios como hipotensión, reducida función renal, erupciones cutáneas y anomalías fetales (Abbenante & Fairlie, 2005). Lo anterior ha incrementado el interés en el estudio de compuestos de origen natural, sin los inconvenientes efectos colaterales. Muchos péptidos derivados de proteínas alimentarias se caracterizan por tener efecto inhibidor *in vitro* de la ECA; este tipo de péptidos han sido aislados de hidrolizados de proteínas lácteas, del huevo, del plasma sanguíneo de ganado vacuno; recientemente se han obtenido de cereales y leguminosas (Matsui & Matsumoto, 2006). Los vegetales representan fuentes alternativas, de menor costo o incluso subutilizadas; las cuales pueden ser utilizadas para la obtención de hidrolizados y péptidos con actividad biológica (Vioque, Sanchez-Vioque, Clemente, Pedroche, & Yust, 2000). Los péptidos inhibidores de ECA, son generalmente de pequeño tamaño y pueden ser absorbidos fácil y rápidamente en el intestino e inhibir a la enzima convertidora, lo que generaría una baja de la presión arterial; si bien tienen una actividad inhibidora *in vitro* menor que los fármacos inhibidores, hasta el momento no han mostrado ningún efecto secundario (Korhonen & Pihlanto, 2003). De esta manera, la actividad biológica que exhiben estos péptidos, potencian su uso como nutracéuticos para el desarrollo de alimentos de tipo funcional.

Los péptidos producidos por hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias también han demostrado tener actividades fisiológicas como la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una agente casual principal de la hipertensión. (Aluko & Monu, 2003)

1.2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

1.2.1. Proteínas en la Quinua

La quinua es un grano con alto valor nutricional, debido principalmente a su alto contenido de proteínas de buena calidad. El contenido de proteína de la semilla es alto, alrededor del 15% en promedio. En comparación con otros cereales, maíz y arroz tienen en general menos proteínas que la quinua, pero algunos tipos de trigo se acercan a su contenido de proteínas. Sin embargo, el valor real de la quinua, consiste en su calidad de proteína, debido a un espectro de aminoácidos más amplio que los cereales y las legumbres, con un mayor contenido de lisina y metionina. La quinua tiene dos proteínas principales de almacenamiento: la primera es la globulina soluble en sal 11S (quenopodin), que representa el 37% de la proteína total y está compuesta de subunidades, cada una de las cuales consiste en un polipéptido básico y un ácido, con masas moleculares de 20-25 y 30-40 kDa, respectivamente. La segunda proteína principal que representa el 35% del total, es una proteína de tipo 2S también conocida como albúmina y tiene una masa molecular de 8-9 kDa. Ambas proteínas se estabilizan con puentes disulfuro en su estado nativo, pero su principal diferencia consiste en su solubilidad a pH 5, donde la mayor parte del 11S se precipita, mientras que el 2S permanece soluble. Las características estructurales y de solubilidad distintivas de estas dos proteínas sugieren que sus propiedades funcionales difieren notablemente. Las prolaminas se encuentran en una cantidad muy baja en la quinua, lo que indica que es una semilla sin gluten, adecuada para personas que padecen enfermedad celíaca. (Idrovo, 2014)

Las proteínas son compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas: en la sangre, en la leche, en los huevos y en toda clase de semillas y pólenes. La composición elemental de las proteínas básicamente está conformada por nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y carbono, además de azufre, y en algunos fósforos y hierro.

Las proteínas estructuralmente están formadas por la unión de ciertas sustancias llamadas aminoácidos, que los vegetales sintetizan a partir de los nitratos y las sales amoniacales del suelo. Los animales herbívoros obtienen proteínas de las plantas; el hombre puede obtenerlas de las plantas o de los animales, siendo las proteínas de origen animal de mayor valor nutritivo que los vegetales. Esto se debe a que existen 24 aminoácidos de los cuales 9 son

denominados esenciales para la vida (la leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptófano y para los lactantes se considera la histidina), y en las proteínas animales se encuentran en mayor cantidad. (Eggum, 1997)

1.2.2. Métodos de purificación y separación de proteínas

Antes de caracterizar, se debe realizar una previa purificación de las proteínas, lo que puede hacerse mediante un mecanismo de separación o mediante técnicas cromatográficas. Dependiendo de las propiedades como diámetro, carga eléctrica, dominios hidrofóbicos, interacciones grupales y bioespecíficas, se puede seleccionar una técnica particular. Estos se resumen en la Tabla 1.1. (Nehete, Narkhede, Bhambar, & Gawali, 2013)

Tabla 1.1. Propiedades y técnicas de separación de proteínas

Propiedad de las proteínas	Técnica
Diámetro de la molécula	Cromatografía de exclusión por tamaño
Carga eléctrica de la molécula	Cromatografía de intercambio de iones
Presencia de dominios hidrofóbicos	Cromatografía de fase reversa
Presencia de grupos hidrofóbicos	Cromatografía de interacción hidrofóbica
Interacción bioespecífica	Cromatografía de afinidad

Fuente: Nehete, *et al.*, 2013

1.2.2.1. Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio (SDS)

Esta es una técnica en la que las moléculas cargadas, como las proteínas, se separan de acuerdo con las propiedades físicas, ya que son forzadas a través de un gel por una corriente eléctrica. La muestra principal aplicada al gel se trata con detergente SDS y β -mercaptoetanol, esto desnaturalizará las proteínas y el SDS que se une fuertemente a la molécula no enrollada, hace que se cargue negativamente. El gel de electroforesis en gel SDS-policrilamida (PAGE), separa las proteínas principalmente de acuerdo con el tamaño, porque las proteínas recubiertas con SDS tienen una carga uniforme: relación de masa. (Nehete, Narkhede, Bhambar, & Gawali, 2013)

1.2.2.2. Electroforesis en gel unidimensional

Este tipo de electroforesis puede proporcionar información sobre el tamaño molecular y la pureza de las proteínas, así como el número y el tamaño molecular de sus subunidades. En PAGE, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de los poros en la matriz del gel; el tamaño de poro disminuye en concentraciones de acrilamida más altas. La

combinación del tamaño de poro del gel y la carga, el tamaño y la forma de la proteína determina la tasa de migración de la proteína. (Nehete, Narkhede, Bhambar, & Gawali, 2013)

1.2.2.3. Electroforesis en gel bidimensional

Este tipo de electroforesis separa las proteínas en la primera dimensión por enfoque isoeléctrico y en la segunda dimensión por electroforesis en presencia de SDS. Al separar las proteínas de esta manera, se obtiene información no solo sobre el tamaño de una proteína, como en los geles unidimensionales, sino también sobre la carga de una proteína. Los geles bidimensionales son superiores para resolver mezclas complejas y para evaluar la pureza de las proteínas. (Nehete, Narkhede, Bhambar, & Gawali, 2013)

1.2.3. Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis consiste en descomponer a las proteínas, incluso, en sus aminoácidos constitutivos, los que pueden ser incorporados, luego a organismos vivos.

El agua es uno de los compuestos reaccionantes. Las descomposiciones directas por agua son raras y requieren altas temperaturas y presiones, por lo que normalmente, la hidrólisis se efectúa en presencia de ácidos minerales fuertes o bases fuertes, como catalizadores. También pueden realizarse la acción catalítica de determinadas enzimas, que no intervienen estequiométricamente en la reacción, sólo la aceleran.

Como efecto de la hidrólisis se tiene una reducción del tamaño molecular, así como también cambios estructurales y de polaridad. Se incrementa el carácter hidrofílico por el aumento de la exposición de grupos carboxílicos libres y el carácter hidrófobo, por la exposición de restos de aminoácidos apolares. La solubilidad de las proteínas parcialmente hidrolizadas mejora en todo el rango de pH. (Hill R. , 1965)

1.2.4. Hidrólisis enzimática de Proteínas

La hidrólisis enzimática de proteínas es un bioproceso importante para mejorar las propiedades físicas, químicas, funcionales y nutricionales de las proteínas originales. También es un método eficaz para preparar péptidos activos, que poseen muchas propiedades fisiológicas. En los últimos años, se han aplicado muchos tipos de péptidos en alimentos, medicamentos, cosméticos y otros campos. (Qi & He, 2006)

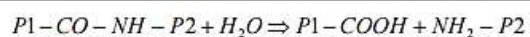
La hidrólisis de proteínas puede producir péptidos hidrófobos amargos, con residuos de leucina o fenilalanina terminales. El sabor amargo es pronunciado si muchos péptidos de bajo peso molecular (menor a 6 kDa) son producidos. Para prevenir la formación de los compuestos amargos, se utiliza una combinación secuencial de endo y exoproteasas, que minimicen su producción y limiten el tiempo de reacción proteolítica.

Los parámetros de proceso más críticos en la hidrólisis son la temperatura, el tiempo de hidrólisis, el pH y como parámetro de control, el grado de hidrólisis. (Hill R. , 1965)

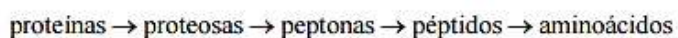
1.2.4.1. Química del enlace peptídico

La reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto.

Las proteasas catalizan esta ruptura del enlace peptídico:



Su actuación continuada sobre la proteína da lugar a las siguientes especies intermedias:



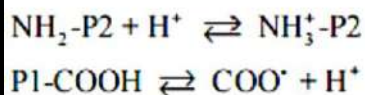
Cada una de estas especies se diferencia fundamentalmente por su solubilidad, y corresponde aproximadamente con los pesos moleculares medios y con la relación nitrógeno amino / nitrógeno total que se recogen en la Tabla 1.2. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

Tabla 1.2. Relación nitrógeno amino / nitrógeno total para diferentes secuencias peptídicas

Especie proteica	Peso molecular (g/mol)	Nitrógeno amino/nitrógeno total
Proteínas	>20000	<0.01
Proteasas	5000 - 10000	<0.01
Peptonas	1000 - 6000	0.1 – 0.5
Péptidos	200 - 500	0.5 – 0.8
Aminoácidos	75 - 200	0.8 – 0.9

Fuente: Benítez e Ibarz, 2008

La hidrólisis del enlace peptídico supone además la liberación de los grupos aminos y carboxilo terminales, estableciéndose los siguientes equilibrios ácido-base en el medio:



Por tanto, el estado de protonización de una proteína depende del pH del medio. A valores de pH superiores a 7.5- 7.8, los grupos carboxilo estarán totalmente disociados y parcialmente los grupos amino, el pH disminuirá. En el caso de pH inferiores a 3.1-3.6 ocurrirá lo contrario y el pH aumentará. En definitiva, si la hidrólisis se produce a valores de pH fuera del rango dado por los valores de pK de los grupos aminos y carboxilo, será necesaria la adición de base o de ácido para mantener el pH constante. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

1.2.5. Proteasas

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio (Tabla 1.3.). Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo-o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico. En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc. Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente, las metalo-proteasas son sobre todo exo-proteasas. Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. (González-Rábade, Badillo-Corona, Aranda-Barradas, & Oliver-Salvador, Production of plant proteases in vivo and in vitro-A review, 2011)

En la Tabla 1.3. se presentan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado y se indica la especificidad de parte de ellas. Los preparados

enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

Tabla 1.3. Tipos de Proteasas Comerciales

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temp (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
<i>Serinproteasa</i>					
Animal	Tripsina		30-60	7-9	-*Lis (o Arg) ---
	Quimiotripsina	Porcino, bovino	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu) ---
	Elastasa			6-8	-*Ala ----
Bacteriana	Substillisin. Carlsberg	Bacillus licheniformes	50-60	6-10	
	Alcalasa				-*Aahf
	Subst. BPN	Bacillus licheniformes	40-55	6-10	
	Substillisin Novo	amyloquefaciens			
<i>Cisteinproteasas</i>					
Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)-
	Bromelaina	Piña	20-65	5-8	AAhf ---
	Ficina	Látex de Ficus		5-8	
<i>Aspartato proteasas</i>					
Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp
	Quimosina	Becerro		4-6	(o Fe, Tir)
Fúngica	Aspergillopeptidasa A	Aspergillus saitoi	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *---
	Newlasa	Rhizopus sp.	40-50	3-6	Similar a la pepsina
<i>Metalo proteasas</i>					
Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	*Carbonilo del AA Terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
Bacteriana	Neutrasa®	Bacillus amyloliquefaciens	40-55	6-7,5	-Fe, Leu, Val *---

	Termolisina	B. thermoproteolyticus	7-9	-Ile, Leu, Val, Fe*---	
Preparación enzimáticas					
Mezcla de papína, quimiopapína y lisozima	Papaína cruda	Fruto de la papaya	5-9	Amplia especificidad	
Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa.	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30-80	7-9	Muy amplia especificidad
Mezcla de serin-, aspartato- y metalo-proteasas.	Veron P. Sumicina LP.				Muy amplia especificidad
	Biocina A	Aspergillus oryzae	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
Mezcla de endo- y exo-proteasas, actividad en pH alcalino y neutro	Pronasa	Streptomyces griseus		7-9	Muy amplia especificidad

Fuente: Benítez, Ibarz & Pagan, 2008

1.2.5.1. Clasificación de proteasas

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las protecciones se clasifican en el subgrupo 4 del grupo 3 (hidrolasas) (114a). Actualmente, las proteasas se clasifican en base a tres criterios principales: (i) tipo de reacción catalizada, (ii) naturaleza química del sitio catalítico, y (iii) relación evolutiva con referencia a la estructura.

Las proteasas se subdividen en dos grupos principales, es decir, exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción. Las exopeptidasas escinden el enlace peptídico proximal a los terminales amino o carboxi del sustrato, mientras que las endopeptidasas escinden los enlaces peptídicos distantes de los extremos del sustrato. En base al grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se clasifican adicionalmente en cuatro grupos prominentes, es decir, serina proteasas, proteasas aspárticas, cisteína proteasa y metaloproteasas. (Webb, 1992)

Tabla 1.4. Tipos de Proteasas y su modo de acción

Proteasa	Modo de acción*
Exopeptidasas	
Aminopeptidasas	●-↓o-o-o-o---
Dipeptidil peptidasa	●-●-↓o-o-o---
Tripeptidil peptidasa	●-●-●-↓o-o---
Carboxipeptidasas	---o-o-o-o-o-↓●
Serina tipo proteasa	
Metaloproteasa	
Cisteína tipo proteasa	
Peptidil dipeptidasa	---o-o-o-o-↓●-●
Dipeptidasas	●-↓●
Omega peptidasas	*-●-↓o-o---
	---o-o-o-↓●-*
Endopeptidasas	----o-o-o-↓o-o-o---
Serina proteasa	
Cisteína proteasa	
Aspártico proteasa	
Metaloproteasa	
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	

*Los círculos abiertos representan los residuos de aminoácidos en la cadena de polipéptidos. Los círculos sólidos indican los aminoácidos terminales, y las estrellas significan los términos bloqueados. Las flechas muestran los sitios de acción de la enzima.

Fuente: Webb, 1992

1.2.5.1.1. Exopeptidasas

Las exopeptidasas actúan solo cerca de los extremos de las cadenas de los polipéptidos. Según su sitio de acción en el término N o C, se clasifican como amino y carboxipeptidasas, respectivamente. (Webb, 1992)

✓ Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas actúan en un extremo N libre de la cadena polipeptídica y liberan un único aminoácido residual, un dipéptido o un tripéptido. Se sabe que eliminan el Met N-terminal que se puede encontrar en las proteínas heterólogas expresadas, pero no en muchas proteínas mareas naturales. Las aminopeptidasas se producen en una amplia variedad de especies microbianas, incluidas bacterias y hongos. (Webb, 1992)

✓ Carboxipeptidasas

Las carboxipeptidasas actúan en los terminales de C de la cadena polipeptídica y liberan un solo aminoácido o dipéptido. Las carboxipeptidasas se pueden dividir en tres grupos principales, serinacarboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas,

según la naturaleza de los residuos de aminoácidos en el sitio activo de las enzimas. (Webb, 1992)

1.2.5.1.2. Endopeptidasas

Las endopeptidasas se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces peptídicos en las regiones internas de la cadena del polipéptido lejos de los extremos N y C. Las endopeptidasas se dividen en cuatro subgrupos en función de su mecanismo catalítico. (Webb, 1992)

✓ **Serina proteasas**

Las serina proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo de serina en su sitio activo. Son numerosos y generalizados entre virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos. Las serina proteasas se encuentran en los grupos exopeptidasa, endopeptidasa, oligopeptidasa y omegapeptidasa. Según sus similitudes estructurales, las serina proteasas se han agrupado en 20 familias, que se han subdividido en unos seis clanes con antepasados comunes. Las estructuras primarias de los miembros de cuatro clanes, quimiotripsina (SA), subtilisina (SB), carboxipeptidasa C (SC) y Escherichia D-Ala- D-Ala peptidasa A (SE) no tienen ninguna relación, lo que sugiere que existen al menos cuatro orígenes evolutivos separados para las serina proteasas. Los clanes SA, SB y SC tienen un mecanismo de reacción común que consiste en una tríada catalítica común de los tres aminoácidos, **serina** (nucleófilo), **aspartato** (electrófilo) e **histidina** (base).

Las serina proteasas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un valor óptimo entre pH 7 y 11. Sus masas moleculares oscilan entre 18 y 35 kDa. (Webb, 1992)

✓ **Proteasas aspárticas**

Las proteasas de ácido aspártico, comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son las endopeptidasas que dependen de los residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría de las proteasas aspárticas muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3 a 4) y tienen puntos isoeléctricos en el rango de pH 3 a 4.5. Sus masas moleculares están en el rango de 30 a 45 kDa. Las proteasas ácidas microbianas exhiben especificidad contra residuos de aminoácidos aromáticos. (Webb, 1992)

✓ **Metaloproteasas**

Las metaloproteasas son los tipos catalíticos más diversos de proteasas. Se caracterizan por el requisito de un ion metálico divalente para su actividad. Se han reconocido unas 30

familias de metaloproteasas, de las cuales 17 contienen solo endopeptidasas, 12 contienen exopeptidasas y 1 contiene endo y exopeptidasas. Las familias de metaloproteasas se han agrupado en diferentes clanes según la naturaleza del aminoácido que completa el sitio de unión al metal. Según la especificidad de su acción, las metaloproteasas se pueden dividir en cuatro grupos, (i) neutro, (ii) alcalino, (iii) Mixobacteria I y (iv) Mixobacteria II. Las proteasas neutras muestran especificidad por aminoácidos hidrófobos, mientras que las proteasas alcalinas poseen una especificidad muy amplia. La proteasa de Mixobacteria I es específica para residuos de aminoácidos pequeños a cada lado del enlace de escisión, mientras que la proteasa Mixobacteria II es específica para el residuo de lisina en el lado amino del enlace peptídico. (Webb, 1992)

1.2.6. Proteasa de *Bacillus licheniformes*, Subtilisin A (Alcalasa)

Las subtilisinas de origen *Bacillus* representan la segunda familia más grande de serina proteasas, tienen una masa molecular de 27,5 kDa. Generalmente, tienen una temperatura óptima de 60 °C y un pH óptimo de 10. Su sitio activo está compuesto por **Ser221**, **His64** y **Asp32**. La conformación del sitio activo de las subtilisinas es similar a la de la tripsina y la quimiotripsina a pesar de la disimilitud en sus disposiciones moleculares generales. (Markland & Smith, 1971)



Figura 1.1. Estructura del subtilisin nativo. Se indican las ubicaciones relativas de los sitios catalíticos
Fuente: Romero-García *et al.*, 2009

1.2.6.1. Mecanismo catalítico de la serina proteasa

El jugador principal en el mecanismo catalítico de las serina proteasas es la tríada catalítica. La tríada catalítica se encuentra en el sitio activo de la enzima, donde se produce la catálisis,

y se conserva en todas las superfamilias de enzimas serina proteasa. Estos tres aminoácidos clave, juegan un papel esencial en la capacidad de escisión de las proteasas. Si bien los miembros de aminoácidos de la tríada están ubicados lejos uno del otro en la secuencia de la proteína, debido al plegamiento, estarán muy cerca uno del otro en el corazón de la enzima. La geometría particular de los miembros de la tríada es muy característica de su función específica: se demostró que la posición de solo cuatro puntos de la tríada caracteriza la función de la enzima que lo contiene. (Iván, Szabadka, Ördög, Grolmusz, & Naray-Szabo, 2009)

Cada aminoácido en la tríada realiza una tarea específica en este proceso:

- La serina tiene un grupo $-OH$ que puede actuar como un nucleófilo, atacando el carbono carbonílico del enlace peptídico escindible del sustrato.
- Un par de electrones en el nitrógeno de la histidina tiene la capacidad de aceptar el hidrógeno del grupo serina-OH, coordinando así el ataque del enlace peptídico.
- El grupo carboxilo en el ácido aspártico a su vez se une al hidrógeno con la histidina, haciendo que el átomo de nitrógeno mencionado anteriormente sea mucho más electronegativo.

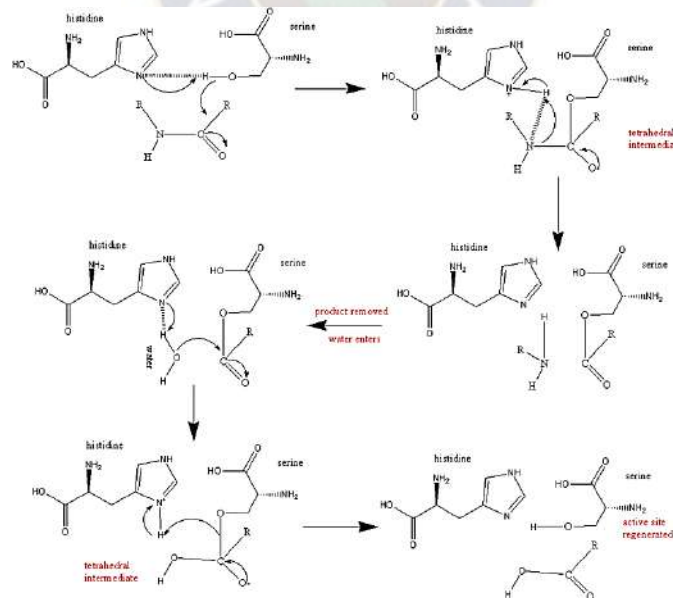


Figura 1.2. Mecanismo de reacción de la serina proteasa

Fuente: http://biology.kenyon.edu/BMB/Jmol2008/Paige_Anna/Mechanism.html

1.2.7. Proteasa de *Aspergillus oryzae* (Flavourzima)

Es una proteasa compleja fúngica/peptidasa, producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae* y contiene actividades de endoproteasa y exopeptidasa. Produce una mezcla de proteasa aspártica, metaloproteasa, serina proteasa y carboxipeptidasa con rangos de pH óptimos de 4-8 y tiene una especificidad muy amplia. (Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K., 2015)

1.2.8. Péptidos con actividad biológica

En los últimos años se han realizado hidrolizados de proteínas de diversas fuentes con la intención de obtener péptidos con potencial bioactividad ya que se ha estudiado que derivados peptídicos pueden ser biológicamente activos (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008), los péptidos consisten en cadenas cortas de 2 a 15 residuos aminoácidos (Torruco-Uco, et al., 2009). Y se sabe que el consumo diario de este nutriente por medio de las leguminosas, en los países en vías de desarrollo, estas contribuyen con el 10% de las proteínas diarias y el 5% del aporte energético en la dieta.

Recientes investigaciones han demostrado que los péptidos de origen animal poseen una o varias actividades biológicas (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008), incluso ha sido posible determinar la secuencia de aminoácidos responsables de dichas actividades (Srihongthong, et al., 2012). En este sentido la bioactividad de los péptidos de proteína de las diferentes fuentes han presentado su funcionalidad como: antihipertensivos (Megías, et al., 2009), antibacterianos (Srihongthong, et al., 2012), anticancerígenos (Aimutis, 2004), antiulcerativos (Tavares y col., 2011), antioxidantes (Alemán, et al, 2011; Valdéz, et al., 2011) por mencionar algunas que incluso han sido identificados y sintetizados químicamente (Yamada, et al., 2008).

En cuanto a los alimentos de origen vegetal, se han estudiado una gran variedad de hidrolizados de proteínas (garbanzo, soya, chícharo, lenteja, frijol, entre otras) con la finalidad de determinar si además de su alto contenido nutricional, poseen alguna actividad biológica, la cual resultaría en un beneficio para la salud del ser humano que lo consume. Dentro de las propiedades farmacológicas más reportadas de las diversas leguminosas destacan la actividad antioxidante y la inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008).

1.2.9. Actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina como control de la hipertensión

1.2.9.1. Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La enzima convertidora de Angiotensina-I (ECA), también llamada peptidildipeptidasa A, pertenece a la familia de la dipeptidilcarboxipeptidasa, participa en el control de la presión arterial mediante la regulación de la homeostasis de electrolitos a través del sistema reninangiotensina. La ECA es una metalopeptidasa de zinc que tiene poca homología de secuencia con los otros miembros de la familia de péptidos.

La ECA humana tiene dos dominios funcionales (N y C), cada uno de los cuales tiene un sitio activo con un sitio de unión a iones de zinc. Los dominios N y C tienen algunas diferencias en sus especificidades de sustrato, formas fisiológicas e inhibidores. Por un lado, los dominios N y C catalizan la hidrólisis de sustratos con eficiencias similares. Sin embargo, se informó que la inhibición del dominio N de la ECA no tiene ningún impacto en la regulación de la presión arterial. Se descubrió que el objetivo del dominio C era suficiente para controlar la presión arterial y, por lo tanto, todos los inhibidores se dirigen a este sitio.

El zinc es un componente catalítico importante de la ECA. Como se muestra en la Figura 1.3., $\alpha 13$ tiene un motivo de unión a zinc con dos histidinas (His383 y His387) coordinadas con un ion de zinc (+2). Hasta ahora, el mecanismo exacto de los inhibidores de la ECA en el angioedema aún no se ha explicado por completo; pero la relación estructural entre la ECA y los inhibidores está claramente implicada. (Fang, Geng, Liu, & Wang, 2019)

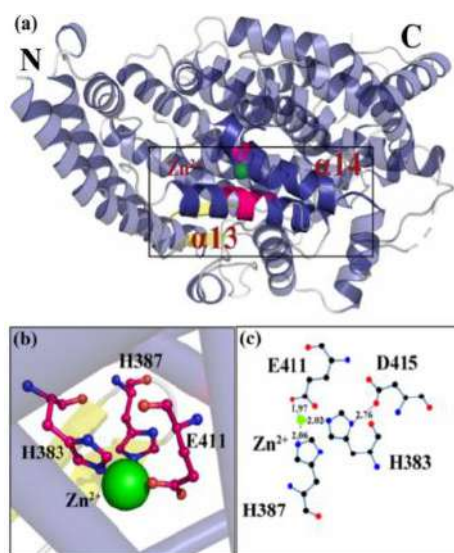


Figura 1.3. Sitios de actividad de la enzima convertidora de Angiotensina. **(a)** Organización de la proteína ACE. Los sitios activos, ubicados entre $\alpha 13$ y $\alpha 14$ de la ECA, se indican mediante un rectángulo negro. **(b)**

Motivo de unión al zinc. Los residuos que rodean al Zn^{2+} están representados por palos rosados. **(c)** La interacción del enlace de hidrógeno entre Zn^{2+} y los residuos clave. La distancia entre los residuos clave y el zinc se muestra un ligplot

Fuente: Fang, *et al.*, 2019

1.2.9.2. Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

Los inhibidores de la ECA son los medicamentos que reducen el aumento de la presión arterial al inhibir la enzima convertidora de angiotensina responsable de la conversión de la Angiotensina I en Angiotensina II. La Angiotensina II es un vasoconstrictor que aumenta la presión arterial. Los inhibidores de la ECA evitan la progresión de la enfermedad renal al reducir la presión intraglomerular mediana por la Angiotensina II. (Arora & Chauhan, 2013)

1.2.9.2.1. Clasificación de los inhibidores de ECA

Los fármacos se dividen en cinco subclases, como se indica a continuación.

1. Análogos que contienen sulfhidrilo (-SH).
2. Análogos que contienen carboxilo (-COOH).
3. Análogos que contienen fosforilo (-PO₂).
4. Derivados hidroxámicos no aminoacídicos.
5. Péptidos.
6. Peptidomiméticos.

La potencia de los fármacos depende de la afinidad de los diversos medicamentos hacia el sitio de unión al zinc. El grupo carboxilo que contiene derivados tiende a ser el más potente de las cinco clases. Además, la actividad inhibidora de la ECA también aumenta con el aumento de la lipofilidad. Sobre esta base, los inhibidores de la ECA pueden clasificarse ampliamente en grupos de afinidad tisular o de afinidad sérica. (Arora & Chauhan, 2013)

Comercialmente, los inhibidores de la carboxilasa de zinc (II) más exitosos incluyen captopril (1), enalapril (2a), enalaprilat (2b) (el metabolito diácido de 2a) y trandopril (3). Estos fármacos (Figura 1.4.) actúan contra la enzima convertidora de Angiotensina (ECA), una peptidasa de Zn que convierte la Angiotensina I en Angiotensina II. Estos compuestos se han utilizado durante años como fármacos exitosos activos por vía oral para reducir la presión arterial alta al disminuir las actividades de la ECA que juegan un papel importante en el regulador de la sangre de reninangiotensina. La interacción del sustrato (Angiotensina I) y los inhibidores con el sitio activo de la ECA se hipotetizó como se muestra en la Figura 1.5.

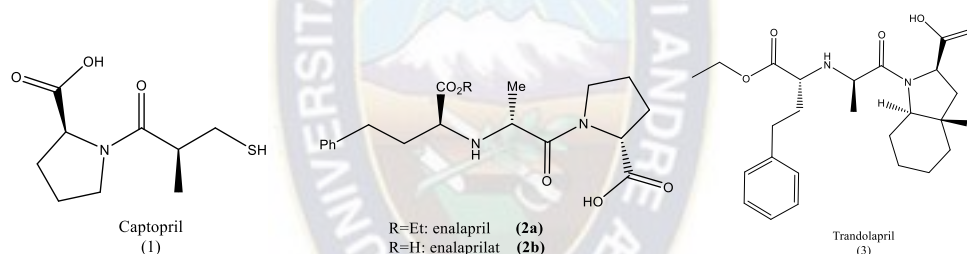


Figura 1.4. Comercialmente, los fármacos inhibidores más exitosos para la enzima convertidora de Angiotensina (ECA)

Fuente: Aoki & Kimura, 2014

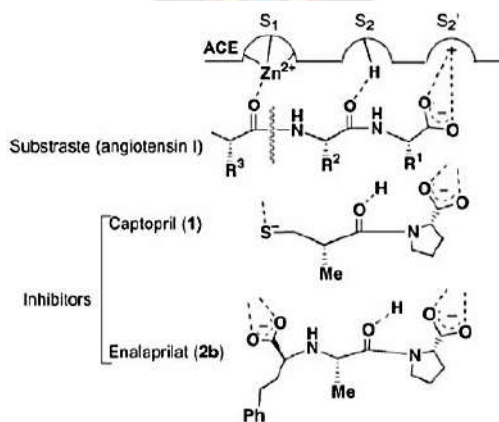


Figura 1.5. Diseño de los inhibidores de la ECA desarrollados a partir de la interacción hipotética del sustrato Angiotensina I con la ECA

Fuente: Aoki & Kimura, 2014

La hipertensión arterial o presión arterial alta afecta alrededor de mil millones de personas en todo el mundo (Nakahara, *et al*, 2010). La hipertensión es un padecimiento multifactorial y uno de los mecanismos más estudiados para su regulación y blanco de acción farmacológica es el sistema renina-angiotensina, conformado por la renina, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la aldosterona y las angiotensinas I (AGI) y II (AGII) (Keidar, *et al* 2007).

Y se ha demostrado que péptidos derivados de la hidrólisis enzimática de diferentes alimentos en particular de origen animal tienen la capacidad de inhibir de forma selectiva la ECA *in vitro* e *in vivo* (Yamada, *et al*, 2008). En algunos casos de la cadena de aminoácidos de los péptidos que han demostrado inhibir la ECA han sido elucidadas, resultando ser una gran alternativa segura y potencial para el control de la hipertensión arterial (Rui, *et al.*, 2013).

El mecanismo del sistema renina-angiotensina-aldosterona es el mayor regulador de la fisiología humana, éste tiene el control de la presión sanguínea, volumen y electrolitos que afectan el corazón, vasculatura y riñones. El proceso de la angiotensina comienza con la hidrólisis del angiotensinogen por efecto de la renina para formar el decapeptido angiotensina I (Ang I). La remoción de dos aminoácidos del carboxilo terminal por efecto de la enzima convertidora de la angiotensina resulta en la formación de un péptido biológicamente activo, angiotensina II (Ang II). El incremento en el nivel de Ang II en condiciones patológicas ha sido reportado en diversos sistemas celulares, es por ello que la reducción de la Ang II es un tema de vital clínica.

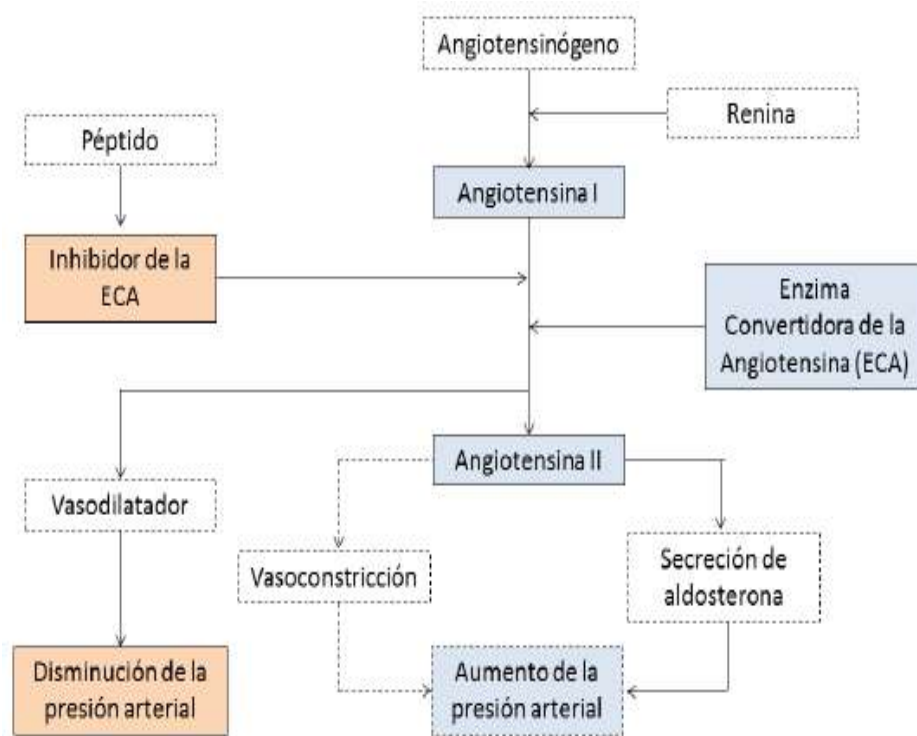


Figura 1.6. Mecanismo de acción de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I (modificado de Keidar y col., 2007)

Fuente: Cachofeiro *et al.*, 1991

Keidar *et al.*, (2007) propusieron un posible mecanismo de acción en el cual la Ang II y la ECA tomaron los roles principales para la inhibición de la Ang I; y en el cual se involucran otras angiotensinas bioactivas, la Ang (1-7) y ACE2 en un sistema de acción más complejo (Figura 1.6.). En el cual se muestra el siguiente fenómeno: primero los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) actúan produciendo un bloqueo competitivo de la ECA. Estos inhiben también la endopeptidasa neutra que degrada la bradicina, por lo que su administración aumenta la producción de cininas vasodilatorias. Finalmente, los IECA disminuyen el tono simpático y los valores plasmáticos de ADN estimulados por la angiotensina II (Cachofeiro *et al.*, 1991)

Existen inhibidores de la ECA conocidos, sin embargo, éstos tienden a ser de origen químico y controlar la hipertensión llegan a afectar otros órganos. (González-García *et al.*, 2002).

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar el análisis proximal de dos variedades de quinua (Quinua Real Blanca y Quinua Jacha Grano)
- ✓ Obtener hidrolizados proteicos utilizando dos proteasas comerciales, Alcalasa y Flavourzima a partir de las dos variedades de quinua.
- ✓ Determinar el Grado de Hidrólisis (GH) de los hidrolizados enzimáticos por el método pH STAT de las dos variedades de quinua.
- ✓ Evaluar la actividad antihipertensiva *in vitro* de hidrolizados enzimáticos (Alcalasa y Flavourzima) y fracciones peptídicas de las dos variedades de quinua.

1.4. PARTE EXPERIMENTAL

1.4.1. Materiales, equipos y reactivos

1.4.1.1. Materiales

- Balón de tres bocas inclinada de 50 mL
- Bolsa de polietileno
- Columna de exclusión molecular Sephadex G-25
- Crisoles
- Cubeta de cuarzo
- Desecador
- Espátula
- Kitasato 500 mL
- Magnetos
- Micropipeta Variable 10-100 μ L (SOCOREX, Acura 825)
- Micropipeta Variable de 100-1000 μ L (SOCOREX, Acura 825)
- Papel Whatman N°4
- Parafilm
- Pinzas metálicas
- Placa Petri
- Placas TLC (Merck, Silicagel 60 F₂₅₄.)
- Probeta de 100 mL

- Tamiz de 250 μm (No. 60) (Retschun-ASTM E11)
- Termómetro de mercurio (-10 a 110°C)
- Tips para micropipeta de 100 y 1000 μL
- Tubos de centrifugación de 10 mL
- Tubos de ensayo de 5 mL
- Vaso de precipitado de 50, 250 y 500 mL

1.4.1.2. Equipos

- Agitador magnético (Cat.-M6)
- Balanza analítica (Precisa-XT 120A)
- Baño maría (Mettler-WNB10)
- Bomba de vacío (Vacumbrand-ME2C)
- Centrifugadora (PowerSpin™-LX CENTRIFUGE)
- Equipo de Extractor Soxhlet
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific-GENESYS10 UV-VIS)
- Estufa Universal (Mettler-UN55)
- Liofilizador (BIOBASE-BK FD18P)
- Moedor-dosificador de granos (La Pavoni S.p.A.-Zip)
- Mufla (WiseTherm®)
- pH metro (Thermo Scientific™ Orion Star-A120)
- Placa calefactora con agitador magnético (Heidolph™ MR)
- Rotaevaporador (Heidolph-Laborota 4011 digital)
- Sistema de reflujo

1.4.1.3. Reactivos

- 1-Butanol 99.89 % (J.T.Backer)
- Acetato de etilo q.p. (destilado)
- Ácido acético glacial 99.0 % (Biopack)
- Ácido bórico 99.5 % (Promega)
- Ácido clorhídrico 36.5-38.0 % (J.T. Baker®)
- Ácido sulfúrico 95.0 – 98.0 % (J.T.Backer)
- Agua destilada
- Alcalasa ≥ 2.4 U/g (Protease from *Bacillus licheniformes*) (Sigma-Aldrich)

- Alcohol etílico 96°
- Cloruro de sodio 99.0 % (Sigma-Aldrich)
- Enzima convertidora de Angiotensina 2.0 U/ mg proteína (Sigma-Aldrich)
- Éter de petróleo fracción 40-60°C (destilado a partir de la gasolina)
- Flavourzima ≥ 500 U/g (Protease from *Aspergillus oryzae*) (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio 98.0 % (MACRON)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratado 99.0 % (Sigma-Aldrich)
- Ninhidrina monohidratado 99,0%, (J.T.Backer)
- Sodio Fosfato Dibásico Anhidro 99,0 % (Biopack)
- Sodio Fosfato Monobásico Anhidro 99,0% (Biopack)

1.4.2. Muestras

La variedad Quina Real Blanca del Altiplano Sur, fue otorgada por la Empresa IRUPANA ANDEAN ORGANIC FOOD S.A. y la variedad Quinoa Jacha Grano del Altiplano Central, por el Municipio de UMALA LA PAZ, en ambos casos los proveedores dieron el nombre de las variedades otorgadas.

Tabla 1.5. Resumen de las referencias de las muestras estudiadas

Referencia de la muestra	Tipo de muestra	Otorgada por:
QJG	Quinoa Jacha Grano	Municipio de UMALA LA PAZ
QRB	Quinoa Real Blanca	Empresa IRUPANA

1.4.2.1. Matriz

Harina de quinua: Variedades Quinoa Jacha Grano y Quinoa Real Blanca

Para la obtención de harina, se realizó la molienda de los granos con un molidor-dosificador y se tamizó con un tamiz de 250 μm , posteriormente se guardó en bolsas herméticas de plástico.

1.4.3. Análisis proximal de las dos variedades de harina de quinua

Se realizó el análisis proximal de la harina de quinua para las dos variedades en el Laboratorio de Bioorgánica, excepto el análisis de proteínas se realizó en el Laboratorio de Calidad Ambiental. (Anexo 1.1)

Tabla 1.6. Métodos para análisis proximal

Muestras	Ensayo	Método de Ensayo
✓ Harina de Quinoa Jacha Grano	Humedad	NB 312026
	Cenizas	NB 312030
	Grasa	NB 312027
✓ Harina de Quinoa Real Blanca	Proteína	-----*
	Fibra Cruda	NB 312028
	Carbohidratos	NB 312031

*Analizado por el Laboratorio de Calidad Ambiental

1.4.4. Extracción de proteínas de las dos variedades de quinua

1.4.4.1. Obtención de harina desengrasada de las variedades de Quinoa

Se utilizó la metodología de la Norma Boliviana NB 312027 con algunas modificaciones. Se pesó 100.0 g de harina de quinua (QJG y QRB) en papel filtro y se envolvió la muestra, para evitar la pérdida de materia, se introdujo en el extractor Soxhlet y se adicionó al balón recolector éter de petróleo fracción 40-60. Se realizó la extracción por un tiempo de 6 horas, después se realizó la evaporación del solvente con un rotaevaporador.

1.4.4.2. Extracción de proteína de quinua por precipitación isoeléctrica

Para la extracción de la proteína de ambas variedades (QJG y QRB), se siguió la metodología descrita por Nazate (2016) y Scali, *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Se suspendió la harina desengrasada en agua en una relación 1:10 (p/V) y se homogenizó la solución con un agitador magnético. La suspensión acuosa se ajustó a pH 9 con NaOH 1N para solubilizar las proteínas, se agitó la suspensión por 60 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 3400 rpm por 60 min. El sobrenadante se ajustó a pH 4.5 con HCl 1N para precipitar las proteínas, luego se agitó y se centrifugó a las mismas condiciones mencionadas anteriormente separando el sobrenadante del precipitado. El precipitado se ajustó a pH 7, óptimo para los alimentos, posteriormente se realizó dos lavados con agua destilada con la finalidad de obtener una proteína más pura y libre de sustancias ácidas, se liofilizó la proteína durante 72 horas. Se realizó por triplicado.

El rendimiento de la proteína extraída con respecto a la harina desengrasada, se determinó con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{P}{M_{HQ}} * 100$$

Donde:

R = Rendimiento en %

P = Proteína extraída en g

M_{HQ} = Masa de harina de quinua desengrasada en g

1.4.5. Hidrólisis Enzimática de la proteína extraída y determinación del grado de hidrólisis (GH) por el método pH STAT

Para la hidrólisis de la proteína extraída de las dos variedades de quinua (QJG y QRB), se realizó el seguimiento de hidrólisis por la técnica pH-stat. Se utilizó el método descrito por Benitez, *et al.* (2008), Jia, *et al.* (2015) y Torruco (2009) con algunas modificaciones. La hidrólisis se realizó mediante tratamientos individuales con las enzimas comerciales **Alcalasa® 2.4L** y **Flavourzima®**, llevándose a cabo una digestión por 90 min. Se realizó una curva de hidrólisis, la cual se obtuvo de la técnica de pH-stat midiendo cada 5 min. el pH y añadiendo volúmenes de NaOH 1N hasta que el pH sea constante. Se utilizó los siguientes parámetros de hidrólisis: Concentración de sustrato (proteína) 10%, enzima/sustrato en una proporción de 2.5 % (p/p) de Alcalasa a pH 8 y 2.4 % (p/p) de Flavourzima a pH 7, a una temperatura de 50°C para ambas enzimas. La hidrólisis se detuvo calentando la mezcla en un baño de agua hirviendo (85°C) durante 15 min. El hidrolizado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. para eliminar el residuo, el sobrenadante se liofilizó durante 72 horas. Cada análisis se realizó por triplicado.

Tabla 1.7. Resumen de las referencias de las muestras hidrolizadas con la enzima Alcalasa y la Flavourzima, para las dos variedades de quinua

Enzima	Referencia de la muestra	Muestra hidrolizada
Alcalasa	HA-QJG	Hidrolizado de la Quinua Jacha Grano
	HA-QRB	Hidrolizado de la Quinua Real Blanca
Flavourzima	HF-QJG	Hidrolizado de la Quinua Jacha Grano
	HF-QBR	Hidrolizado de la Quinua Real Blanca

El grado de hidrólisis de la proteína, se determinó con la siguiente fórmula:

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} * 100$$

Donde:

GH = Grado de hidrólisis en %

h = N° de enlaces peptídicos hidrolizados en meq/g

h_{tot} = N° total de enlaces peptídicos presentes en la proteína en meq/g

1.4.6. Separación de las fracciones peptídicas mediante cromatografía de exclusión molecular

Se empleó la metodología propuesta por Nieto (2013) y Bojórquez, *et al.* (2013) con modificaciones. Se pesó 50.0 mg de los hidrolizados (HA-QJG, HA-QBR, HF-QJG y HF-QBR) y se disolvió con tampón borato pH 8.0 para los hidrolizados con Alcalasa y tampón fosfato pH 7.0 para los hidrolizados con la Flavourzima. La separación de las fracciones peptídicas se realizó mediante tratamientos individuales para cada hidrólisis. Se inyectó la muestra en una columna Sephadex G-25, se recolectó en tubos de 5 mL a un flujo de 0.5 mL/min. y se secó las fracciones peptídicas a 37°C, obteniéndose 40 fracciones en total para cada hidrolizado (HA-QJG, HA-QBR, HF-QJG y HF-QBR), para su seguimiento se realizaron placas TLC, de las cuales se unieron las fracciones similares y se obtuvieron 19 fracciones del HA-QJG, 7 fracciones del HA-QRB, 14 fracciones del HF-QRB y 6 fracciones del HF-QJG.

1.4.7. Determinación de la Actividad Antihipertensiva *in vitro* de los hidrolizados y fracciones peptídicas obtenidos a partir de las dos variedades de quinua

Se determinó por el método de Castro, *et al.* (2006) y Wu, *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. El sustrato Hipuril-histidil-leucina (HHL) se disolvió en tampón borato 0.1 M con NaCl 0.3 M, pH 8.3, para obtener una concentración final 5 mM., y la enzima ECA se disolvió en 2.5 mL del mismo tampón. A 100 µL de sustrato se añadió 40 µL de muestra de una concentración 2.0 mg/mL (HA-QJG, HA-QBR, HF-QJG, HF-QBR y las fracciones peptídicas obtenidas para cada variedad de quinua). Se adicionó 20 µL de la enzima ECA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 60 min en un baño de agua. La enzima se desactivó con 250 µL de HCl 1N. El ácido hipúrico formado se extrae con 1700 µL de acetato de etilo. Se agitó la mezcla en vórtex durante 20 s., se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. a

temperatura ambiente. Se tomó 1000 μL de la fase orgánica que se evaporó por calentamiento a 95°C durante 10 min. El residuo de ácido hipúrico se redissuelve en 1500 μL de agua destilada y se agitó durante 20 s.. Se midió la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

El blanco de muestra contiene sustrato, enzima y 40 μL de tampón borato 0.1 M con NaCl 0.3 M, pH 8.3 en lugar de la muestra. Como control positivo se usó Enalapril (inhibidor), (2.0 mg/mL) se siguió el mismo procedimiento usado para la muestra.

Para determinar el porcentaje de inhibición de la ECA se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{IECA} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} * 100$$

Donde:

IECA = Inhibición de la ECA en %

A_{control} = Absorbancia del control positivo

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra

A_{blanco} = Absorbancia del blanco de muestra

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Análisis proximal de las dos variedades de harina de quinua

La composición proximal de las harinas de quinuas se muestra en la Tabla 1.8.. El contenido de humedad en la harina de quinua Jacha Grano (QJG) fue de 11.38 ± 0.02 % este valor es significativamente ($p \leq 0.05$) mayor al 10.67 ± 0.80 % presente en la harina de quinua Real Blanca. En cuanto al contenido de cenizas se presentaron diferencias significativas en ambas variedades siendo significativamente ($p \leq 0.05$) mayor el contenido en la QJG que en la harina QRB con un porcentaje de 2.92 ± 0.03 y 2.37 ± 0.01 % respectivamente.

La grasa presente en la harina QJG es de 6.50 ± 0.06 %, este dato no es significativamente diferente ($p \geq 0.05$) al 5.70 ± 0.40 % observado en la harina QRB, por otro lado, el porcentaje de proteína fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) en ambas harinas con 15.02 ± 0.24 y 13.00 ± 0.06 % para la harina QRB y QJG, respectivamente, con respecto a la fibra cruda, los resultados 3.10 ± 0.01 % y 3.01 ± 0.03 % para la harina QRB y QJG, respectivamente, no presentan diferencia significativa ($p \geq 0.05$). Finalmente, los carbohidratos presentes en

la harina QRB fue 63.10 ± 0.01 % y 63.19 ± 0.03 % para la harina QJG, no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Tabla 1.8. Resultados del Análisis Proximal para las dos variedades de quinua

Ensayo	Harina de Quinua Real Blanca (%)	Harina de Quinua Jacha Grano (%)
Humedad	10.67 ± 0.80^b	11.38 ± 0.02^a
Cenizas	2.37 ± 0.01^b	2.92 ± 0.03^a
Grasa	5.70 ± 0.40^a	6.50 ± 0.06^a
Proteína	15.000 ± 0.003^a	13.00 ± 0.06^b
Fibra Cruda	3.10 ± 0.01^a	3.01 ± 0.03^a
Carbohidratos	63.10 ± 0.01^b	63.19 ± 0.03^b

Promedio de tres repeticiones ($n=3$) \pm desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre variedades (ANOVA $p \leq 0.05$).

Los componentes de humedad, cenizas y fibra cruda, se encuentran dentro de los rangos propuestos por Romo (2006) y Repo-Carrasco (1992). Existen números estudios que aportan datos acerca de la composición proximal de las harinas, sin embargo, la mayoría de ellos no pertenecen a nuestro país. Es necesario contar con información nacional para establecer valores promedios a partir de datos que contemplen la realidad local.

El contenido de grasa y proteína varían y difieren de los datos obtenidos por los autores mencionados anteriormente, probablemente se deba al lugar de procedencia de las muestras (suelo, precipitación, temperatura, altitud, resistencia a heladas, sequía, salinidad o acidez).

1.5.2. Extracción de proteínas de las dos variedades de quinua por precipitación isoeléctrica

Las extracciones de proteínas se obtuvieron por solubilización de la proteína presente en la harina de quinua desengrasada (QRB y QJG) a pH 9.0 y posterior precipitación isoeléctrica a pH 4.5.

Las proteínas extraídas a pH alcalino tienen una preponderancia de especies cargadas negativamente debido a la ionización de los grupos carboxilos y la desprotonación de los grupos amino, un fenómeno que mejora la interacción proteína-solvente; la repulsión electrostática resultante entre las proteínas con carga similar las mantiene separadas y

fomenta su interacción con el solvente, lo que aumenta la solubilidad de la proteína. (Valenzuela, Abugoch, Tapia, & Gamboa, 2013)

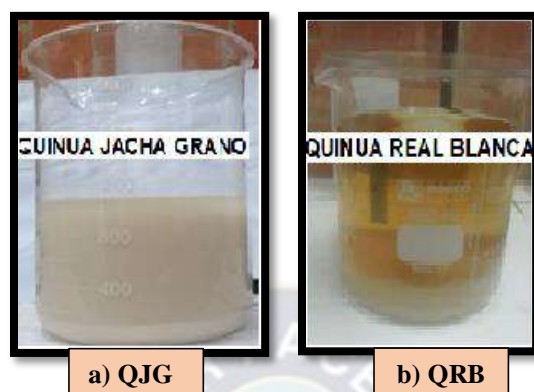


Figura 1.7. Precipitación de las proteínas de las dos variedades: **a)** Quinua Jacha Grano (QJG), **b)** Quinua Real Blanca (QRB)

Tabla 1.9. Rendimiento de proteína extraída en las dos variedades de quinua

Variedad de Quinua	Proteína Aislada/100g Harina* (g)	Rendimiento de Proteína extraída* (%)
Quinua Real Blanca	6.150 ± 0.002	6.15
Quinua Jacha Grano	4.320 ± 0.001	4.32

*Promedio de tres repeticiones (n=3) ± desviación estándar

Con respecto a los resultados de la Tabla 1.9., se observa que la QRB es la que contiene mayor porcentaje de proteína de 6.15%, en cambio la QJG, tiene menor porcentaje de proteína de la Quinua Real.

El valor reportado (6.15 %) para la variedad Quinua Real Blanca se encuentra dentro del rango reportado según Mira (2016) obtuvo 6,75 % de rendimiento del aislado de la proteína de quinua, otro estudio realizado por Díaz (2016), obtuvo resultados de 6,10 % de rendimiento para la quinua negra, 8,77 % para la quinua amarga y 6.60 % para la quinua dulce. Por otra parte, en contraste con el resultado (4.23 %) para la Quinua Jacha Grano, no se encuentra dentro de los rangos reportados por estos mismos autores, el rendimiento de la proteína aislada está por debajo.

1.5.3. Determinación del grado de hidrólisis (GH) por método pH STAT

En las **Figuras 1.8. y 1.9.** se muestran las curvas de hidrólisis para cada enzima (GH vs. tiempo), usando para el seguimiento de la reacción, la medición de aminos libres por consumo de base necesario para mantener el pH de la reacción constante. A medida que transcurre el tiempo de reacción el grado de hidrólisis (GH) aumenta. Si bien el comportamiento de cada enzima es diferente, a los 85 min. el GH para ambas enzimas es similar.

Con el incremento del tiempo de hidrólisis, el GH de la proteína de quinua aumentó rápidamente y luego tendió a permanecer constante hasta cierto tiempo. Entre las dos proteinasas, el grado de hidrólisis de la Alcalasa (**QRB=26.20 %**, **QJG=26.24%**) fue mayor que la Flavourzima (**QRB=24.95 %**, **QJG=24.92%**)

Con respecto a la enzima Alcalasa, es una endopeptidasa, actúa sobre el enlace peptídico, rompiendo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo, además que la hidrólisis proteolítica no es una sola reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008), se debe al cambio de pH rápidamente con el transcurso del tiempo. Después de los 85 min, la enzima deja de actuar, terminando la hidrólisis, manteniéndose el pH constante.

Según el autor Huai, *et al.* (2011), el grado de hidrólisis a 180 min. reporta de 10.9 % para el hidrolizado de la caseína con Alcalasa, con respecto a la autora Almeida (2018), obtuvo 28.0 % de GH para el hidrolizado a partir de la quinua orgánica.

Con respecto a Ochoa (2017) reporta 36.72 % de GH a partir del hidrolizado de cañihua. Según Zhu, *et al.* (2006), a los 180 min., el GH alcanzó aproximadamente 23 %, a partir del hidrolizado de proteína de germen de trigo.

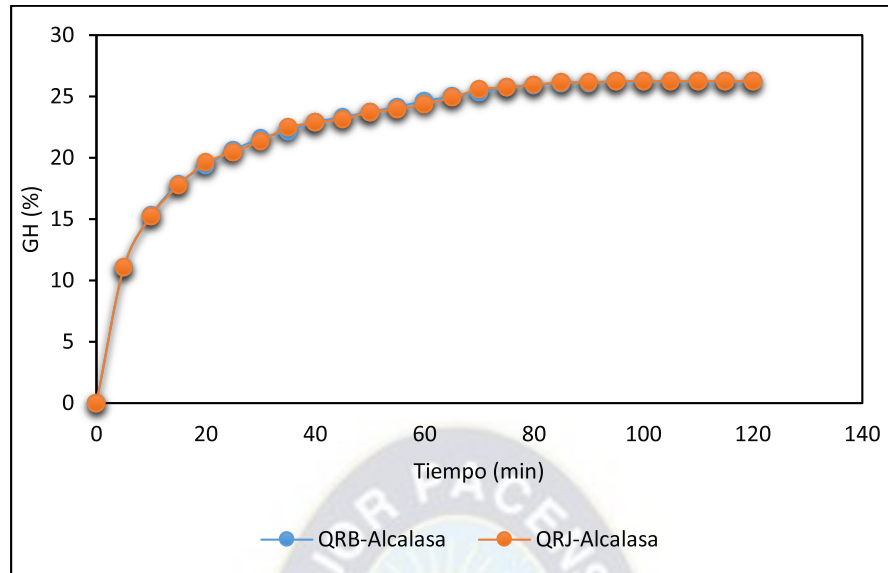


Figura 1.8. Grado de hidrólisis con la enzima Alcalasa para las dos variedades de quinua (QBR y QJG)

La enzima Flavourzima es una endo-exopeptidasa que rompe el extremo N-terminal de las cadenas de péptidos, es así que la hidrólisis con esta enzima, resulta la liberación de aminoácidos N-terminal, donde el primer aminoácido hidrolizado es la leucina, aunque pueden ser otros, como la prolina, y el último aminoácido hidrolizado puede ser la prolina. (Hammershoj, *et al.*, 2008)

Ochoa (2017) trabajó en la hidrólisis de la proteína de cañihua y obtuvo GH de 8.50 % a 180 min. Por su parte, Zang, *et al.* (2011) en la hidrólisis de la proteína aislada de la soya, logró un GH de 23 % a 120 min.. Kongo-Dia-Moukala, (2011) obtuvo 12.25 % de GH a 90 min de a partir del hidrolizado de la proteína del maíz.

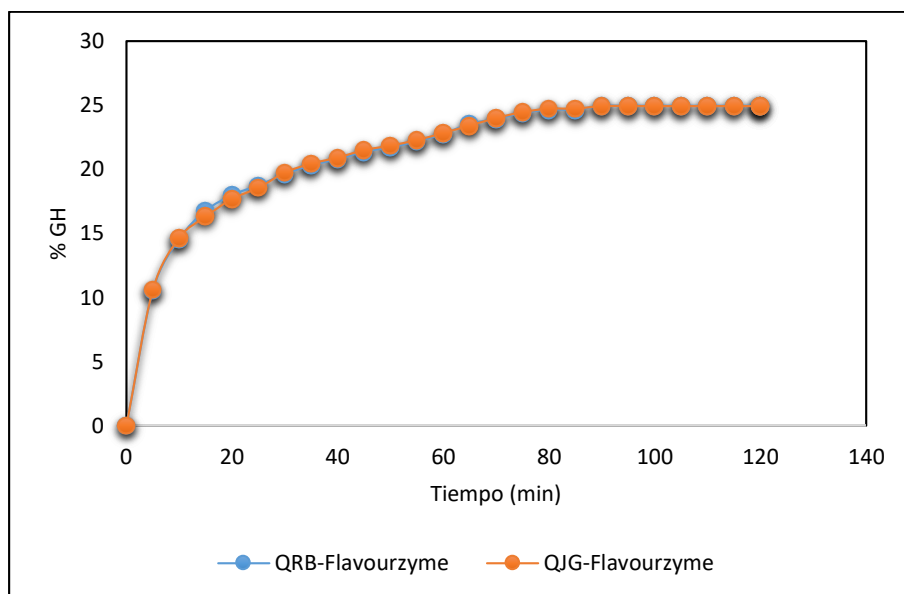


Figura 1.9. Grado de hidrólisis con la enzima Flavourzyme para las dos variedades de quinua (QBR y QJG)

1.5.4. Evaluación de la Actividad Antihipertensiva *in vitro* de hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas obtenidos a partir de las dos variedades de quinua

De acuerdo a la **Tabla 1.10**, los hidrolizados con la enzima Alcalasa para la QRB presentó un 68.20 % y para la QJG un 60.20 % de actividad inhibitoria de ECA, los resultados mostraron valores superiores al 50% de inhibición. En cambio, para los hidrolizados con la enzima Flavourzima, se muestra que la QRB, expresó la más alta actividad inhibitoria de ECA (80.14%) mientras que la variedad QJG exhibió una actividad más baja (75.42%).

Tabla 1.10. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de los hidrolizados con la Alcalasa y la Flavourzyme para las dos variedades de quinua

Muestra	Inhibición de la ECA %
Enalapril	86.57 ± 0.05
HA-QJG	60.20 ± 0.03
HA-QRB	68.20 ± 0,02
HF-QJG	75.42 ± 0.08
HF-QRB	80.14 ± 0.06

Observando la **Figura 1.10.**, el que presentó mayor capacidad de inhibición de la ECA es el hidrolizado con la enzima Flavourzyme de la variedad QRB, con un valor 80.14 %, con respecto al hidrolizado con la Alcalasa se tiene 68.20%. de la misma variedad.

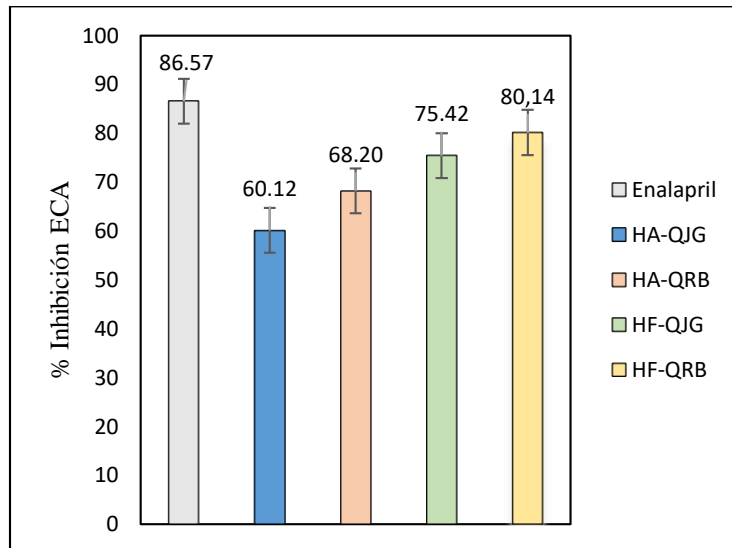


Figura 1.10. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de los hidrolizados con la Alcalasa y la Flavourzyme para las dos variedades de quinua

Guerrero-Ochoa *et al.*, 2015 reportaron una inhibición de 85% en péptidos de quinua, Cisneros, 2017 indica que el hidrolizado de quinua presentó un valor de 59.10% de inhibición de la ECA y Gangopadhyay *et al.*, 2016 encontraron una inhibición de 47.23% en péptidos de cebada. Estos autores indicaron, además, que el enalapril (el inhibidor sintético de la ECA más empleado en la industria farmacéutica) presenta 87.46% de inhibición. Por su parte, Gomes *et al.*, 2016 reportan que la quinua presenta mayor inhibición de la ECA que la kiwicha, el trigo sarraceno y diversos cereales. Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo, con los autores mencionados anteriormente, se puede indicar que los valores reportados tienen un mayor efecto en la capacidad de inhibir la ECA a excepción de los autores Guerrero-Ochoa que reportan una inhibición mayor al 80%.

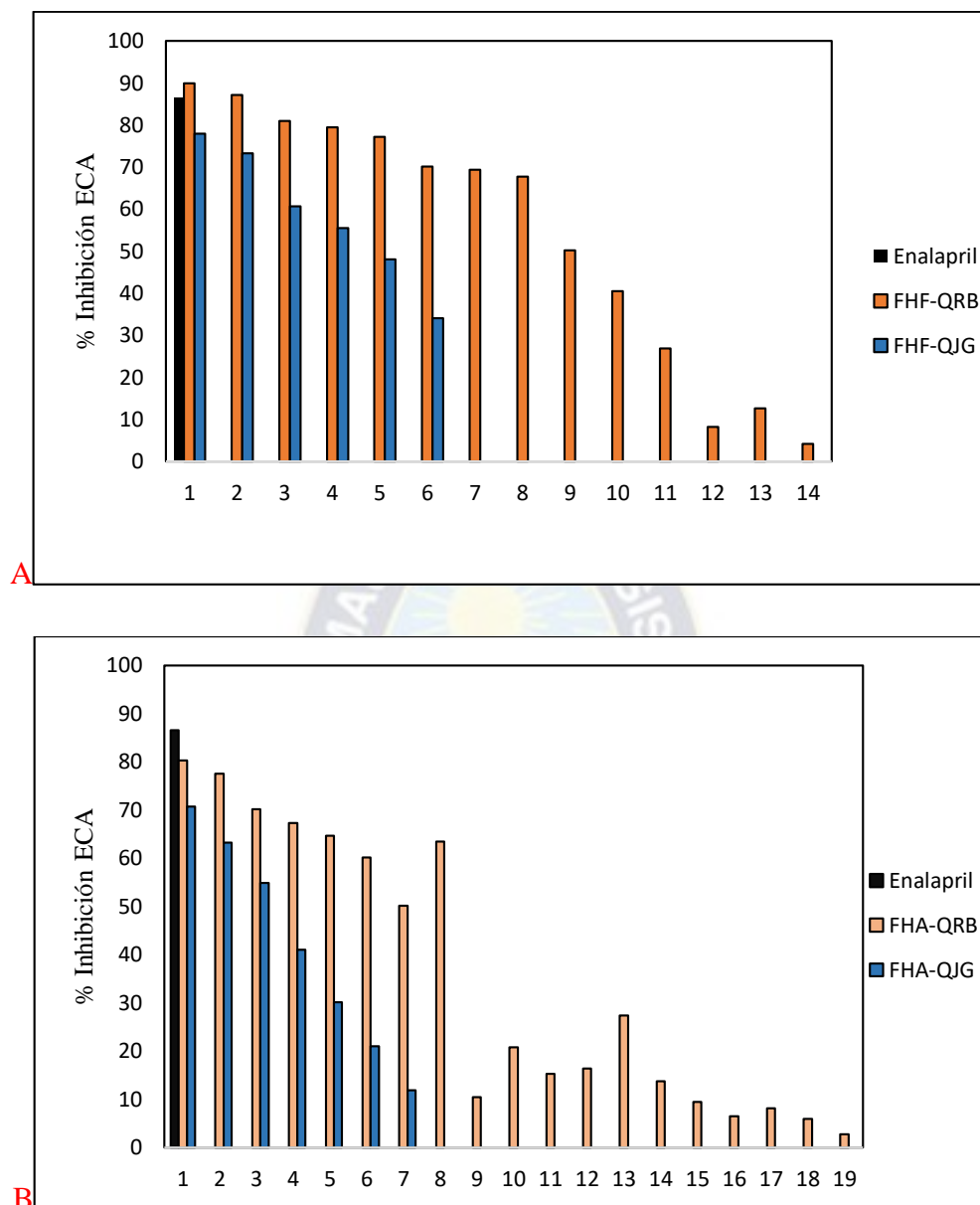


Figura 1.11. Porcentaje de Inhibición de la ECA, de las fracciones peptídicas a partir de los hidrolizados con la Flavourzyme (A) y Alcalasa (B) para las dos variedades de quinua

Como se muestra en la **Figura 1.11.**, las fracciones 1 al 9, obtenidas con la Flavourzyme de la variedad QRB, presentan valores mayores al 50% de inhibición de la ECA, también se observa que las fracciones 1 al 8 obtenidas a partir de la hidrólisis enzimática con la Alcalasa de la misma variedad muestran valores mayores al 50 % pero menores al 90% de inhibición.

A partir de la hidrólisis enzimática con la Alcalasa de la variedad QJG (**Figura 12**), se obtuvieron las fracciones 1-4 con valores de inhibición mayor al 50%, y las fracciones

restantes, con valores menores al 50% de inhibición. Con respecto a las fracciones obtenidas a partir de los hidrolizados con la Flavourzyme, se tiene que las fracciones 1-4, presentan valores de inhibición mayores al 50 %, se puede decir que las fracciones restantes no presentan valores relevantes de inhibición de la ECA, ya que estos se encuentran por debajo del 50% de inhibición.

1.6. CONCLUSIONES

- Los resultados del análisis proximal de la Harina de Quinoa Jacha Grano (QJG), indican que la humedad, cenizas y grasa superan los valores de la variedad Quinoa Real Blanca (QRB), mientras que la proteína y la fibra es notablemente superior en la QRB.
- A partir del proceso de extracción de las proteínas de ambas variedades de Quinoa a pH 9.0 y posterior precipitación isoelectrica a pH 4.5, se obtuvo rendimientos de proteína aislada de 6.15 % para la variedad QRB y 4.32 % para la QJG.
- Con respecto al Grado de Hidrólisis (GH), con la Alcalasa se obtuvo mayor GH que con la Flavourzima, la hidrólisis con la Alcalasa dio un GH de 26.20 % para la QRB y 26.24% para la QJG y con la enzima Flavourzima se obtuvo grado de hidrólisis menores que con la Alcalasa; 24.95 % para la QRB y 24.92 % para la QJG, como se puede observar todos los hidrolizados son mayores al 10 % de GH. Por lo tanto, como los GH >10 %, estos hidrolizados pueden utilizarse en la formulación de dietas, según estudios realizados.
- La evaluación de la actividad antihipertensiva *in vitro* de los hidrolizados con la Alcalasa, se tiene que la variedad QRB presenta un 68.20 % de inhibición y para la variedad QJG tiene 60.20 % de inhibición, por lo tanto, el que presenta mayor actividad inhibitoria es el hidrolizado de la variedad QRB. Con respecto a las fracciones peptídicas obtenidos a partir de los hidrolizados enzimáticos con la Alcalasa, se muestran que las fracciones 1-9 presentan una actividad antihipertensiva mayor al 50 % de la variedad QRB, y con respecto a la variedad QJG las fracciones 1-4.
- Finalmente, en la evaluación de la actividad antihipertensiva de los hidrolizados con la Flavourzyme, se tiene que la variedad QRB presenta un 80.14 % de inhibición y

para la variedad QJG tiene 75.42 % de inhibición, por lo tanto, el que presenta una muy buena actividad inhibitoria es el hidrolizado de la variedad QRB. Con respecto a las fracciones peptídicas obtenidos a partir de los hidrolizados enzimáticos con la Flavourzyme, se muestran que las fracciones 1-8 presentan una actividad antihipertensiva mayor al 50 % de la variedad QRB y con respecto a la variedad QJG, las fracciones 1-3.

1.7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar diferentes extracciones de proteína, variando los parámetros de extracción: pH básico (solubilización de la proteína), temperatura, con el objetivo de obtener mayor porcentaje de proteína.
- Aplicar técnicas de ultrafiltración y cromatografía para concentrar y aislar las fracciones de los péptidos para lograr su purificación y caracterización.
- Estudiar la composición y las características estructurales de los aislados de proteínas por electroforesis.
- Evaluar otras actividades biológicas de los péptidos, tales como antimicrobiana, antioxidante, etc.

1.8. BIBLIOGRAFÍA

Abbenante, G., & Fairlie, D. (2005). Protease Inhibitors in the Clinic. *Medicinal Chemistry*, 1(1), 71-104.

Abugoch, L. (2009). Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Advances in Food and Nutrition Research*, 1-31.

Adler-Nissen, J. (1976). Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(6), 1090-1093.

Aguilar, J. G., de Castro, R. J., & Sato, H. H. (2019). ALKALINE PROTEASE PRODUCTION BY *Bacillus licheniformis* LBA 46 IN A BENCH REACTOR: EFFECT OF TEMPERATURE AND AGITATION. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 615-625.

Ahamed, N. T., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., & Pal, M. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19(1), 61-70.

Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. *In Proteins in food processing*, 389-412.

Aluko, R., & Monu, E. (2003). Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(4), 1254-1258.

Alvarez-Jubete, L., Auty, M. A., & Gallagher, E. (2009). Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, 230(3), 437-445.

Arora, P., & Chauhan, C. (2013). ACE Inhibitors: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(2), 532-548.

Asao, M. y. (2010). Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. *Food Science and Technology Research*, 16(2), 163-168.

Bastidas, E. G., Roura, R., Rizzolo, D. A., Massanés, T., & Gomis, R. (2016). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from nutritional value to potential health benefits: an integrative review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6(3).

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.

Berti, C., Ballabio, C., Restani, P., Porrini, M., Bonomi, F., & Iametti, S. (2004). Immunochemical and molecular properties of proteins in *Chenopodium quinoa*. *Cereal Chem*, 81(2), 275-277.

Boardbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761-1805.

Bojórquez, E., Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. Barcelona: OmniaScience.

Bravo, R., Andrade, K., Valdivia, R., & Soto, J. (2010). Investigaciones sobre especies olvidadas y subutilizadas. Granos Andinos (Quinoa, cañahua/cañihua y amaranto/kiwicha). Bolivia y Perú: Bioversity International.

Breugelmans, B., Simonet, G., van Hoef, V., Van Soest, S., & Broeck, J. V. (2009). Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides*, 30(3), 622-632.

- Brinegar, C., & Goundan, S. (1993). Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(2), 182-185.
- Brinegar, C., Sine, B., & Nwokocha, L. (1996). High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(7), 1621-1623.
- Byun, H. G., & Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12), 1155-1162.
- Castro, M., López-Alonso, M., Rosina, Sánchez, R., & Ramos, M. (2006). *España Patente n° 2 253 036*.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 131-141.
- Chaurasia, P. K., Yadav, R. S., & Yadava, S. (2013). A review on mechanism of laccase action. *Res. Rev. Biosci*, 7(2), 66-71.
- Chen, S. T., & Wang, K. T. (1999). Chemo-Enzymatic Synthesis of Optically Active Amino Acids and Peptides. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 46(3), 301-311.
- Da Silva, R. R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(1), 1-19.
- Darewicz, M., Minkiewicz, P., Dziuba, M., & Panfil, T. (2012). Zastosowanie drugich i czwartych pochodnych widm UV do identyfikacji niskocząsteczkowych frakcji produktów hydrolizy kazeiny-beta przez plazminę. *Zywnosc: Nauka, Technologia, Jakosc*, 4(83), 151-160.
- de Castro, R. J., & Sato, H. H. (2014). Protease from *Aspergillus oryzae*: biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities. *Journal of Food Processing*, 2014.
- Dunstan, D., Zimmet, P., Welborn, T., de Courten, M., Cameron, A., Sicree, R., & ... Shaw, J. (2002). The Rising Prevalence of Diabetes and Impaired Glucose Tolerance: The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*, 25(5), 829-834.
- Eggum, B. (1997). Nutritional Aspects of Cereal Proteins. En A. R. In: Muhammed A., *Genetic Diversity in Plants* (págs. 349-369). Boston: Springer.

El Nockrashy, A. S., Mukherjee, K. D., & Mangold, H. K. (1977). Rapeseed protein isolates by countercurrent extraction and isoelectric precipitation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 25(1), 193-197.

El Sohaimy, S. (2012). Functional Foods and Nutraceuticals-Modern Approach to Food Science. *World Applied Sciences Journal*, 20(5), 691-708.

Fang, L., Geng, M., Liu, C., & Wang, J. M. (2019). Structural and molecular basis of angiotensin-converting enzyme by computational modeling: Insights into the mechanisms of different inhibitors. *PLoS ONE*, 14(4).

Fatah, B. A. (2016). *Anti-hypertensive (Angiotensin converting enzyme-inhibitory) peptides released from milk proteins by proteolytic microorganisms and enzymes*. Doctoral dissertation, Victoria University.

Figuroa-Hernández, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Calcium and iron binding peptides production by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NCFB 712. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 259-267.

Föste, M., Elgeti, D., Brunner, A., Jekle, M., & Becker, T. (2015). Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 20–26.

Fuentes, F., & Paredes-González, X. I. (2013). Nutraceutical perspectives of quinoa: biological properties and functional applications. *FAO and CIRAD: state of the art report of quinoa in the world in*, 286-299.

Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., & Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Food Process Technol*, 3(3), 146-56.

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J., Aranda-Barradas, J., & Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. *Biotechnology Advances*, 29, 983–996.

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J., Aranda-Barradas, J., & Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro-A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983-996.

Goudarzi, M., Madadlou, A., Mousavi, M. E., & Emam-Djomeh, Z. (2012). Optimized preparation of ACE-inhibitory and antioxidative whey protein hydrolysate using response surface method. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 641-653.

Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa

(*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 431-445.

Guerreo-Ochoa, M. R., Pedreschi, R., & Chirinos, R. (2015). Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Science & Technology*, 50(8), 1815-1822.

Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 2(3), 27-47.

Hill, R. (1965). Hydrolysis of Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 20, 37-107.

Hirsch, A. (2003). Vascular disease, hypertension, and prevention: "from endothelium to clinical events". *Journal of the American College of Cardiology*, 42(2), 377-379.

HrLLt, R. L., & Schmidt, W. R. (1962). *The complete enzymic hydrolysis of proteins*.

http://biology.kenyon.edu/BMB/Jmol2008/Paige_Anna/Mechanism.html

Hunkapiller, M. W., Forgac, M. D., & Richards, J. H. (1976). Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry*, 15(25), 5581-5588.

Hussain, F., Arana-Peña, S., Morellon-Sterling, R., Barbosa, O., Braham, S. A., Kamal, S., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Further stabilization of Alcalase immobilized on glyoxyl supports: amination plus modification with glutaraldehyde. *Molecules*, 23(12), 3188.

Idrovo, M. (2014). Evaluation of technical feasibility of dry fractionation as a method to obtain novel protein foods from quinoa. *WageningenUR*.

Isomas, B., Almgren, P., & Tuomi, T. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated. *Diabetes Care*, 24, 683-689.

Iván, G., Szabadka, Z., Ördög, R., Grolmusz, V., & Naray-Szabo, G. (2009). Four spatial points that define enzyme families. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(4), 417-420.

Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J., Deleu, L. J., & Delcour, J. A. (2017). Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa (*Chenopodium* spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 39-58.

Jia, J., Wu, Q., Yan, H., & Gui, Z. (2015). Purification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of ultrasonic-pretreated silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein. *Process Biochemistry*, 50(5), 876-883.

KIM, J. H., Dae-Hyoung, L. E., Jong-Soo, L. E., CHUNG, K. S., & JEONG, S. C. (2004). Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. 1318-1323.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for Designing Future. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960.

Li, G. H., Le, G. W., Liu, H., & Shi, Y. H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11(4), 281-287.

Lindeboom, N. (2005). *Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.* Doctoral dissertation.

Liu, C., Liu, W., Feng, Z., & Li, D. (2014). Aggregation of whey protein hydrolysate using Alcalase 2.4 L. *PloS one*, 9(10), e109439.

Liu, J. (2019). Quinoa. *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*, 207-216.

Lu, J., Ren, D. F., Xue, Y. L., Sawano, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7166-7171.

Mahdavi-Yekta, M., Nouri, L., & Azizi, M. H. (2019). The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from quinoa. *Food science & nutrition*, 7(3), 930-936.

Markland, F., & Smith, E. (1971). 16 Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. *The Enzymes*, 561-608.

Márquez, M., & Vázquez, M. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35, 111–117.

Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530.

Matsui, T., & Matsumoto, K. (2006). Antihypertensive peptides from natural resources. *Advances in Phytomedicine*, 255-271.

- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Montilha, M. S., Sbroggio, M. F., Figueiredo, V. R., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2017). Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions of okara with endopeptidase Alcalase. *International Food Research Journal*, 24(3), 1067.
- Moreno-Limón, S., & González-Luna, R. (2018). Antihypertensive activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 15(4), 22-26.
- Nasir, M. A., Pasha, I., Butt, M. S., & Nawaz, H. (2015). Biochemical characterization of quinoa with special reference to its protein quality. *Pak. J. Agric. Sci*, 52(3), 731-737.
- Nazate, F. (2016). *Obtención de Proteína Hidrolizada de Quinoa Chenopodium quinoa willd a partir de un Aislado Proteico*. Ibarra.
- Nehete, J., Narkhede, M., Bhambar, R., & Gawali, S. (2013). Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 107.
- NB 312030 (2006). Cereales – Quinoa en grano- Determinación del contenido de cenizas. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- NB 312031(2006). Cereales – Quinoa en grano- Determinación del contenido de hidratos de carbono. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- NB 312026 (2006). Cereales – Quinoa en grano- Determinación de humedad. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- NB 312028 (2006). Cereales – Quinoa en grano- Determinación del contenido de fibra cruda. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- NB 312027 (2006). Cereales – Quinoa en grano- Determinación del contenido de materia grasa. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- . Piñuel, L., Boeri, P., Zubillaga, F., Barrio, D. A., Torreña, J., Cruz, A., & Carrillo, W. (2019). Production of White, Red and Black Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants*, 8(8), 257.
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308-314.

Quelal, M., Nazate, K., Villacrés, E., & Cuarán, J. (2019). Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinua *Chenopodium quinoa* Willd. *Enfoque UTE*, 10(2), 79-89.

Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., & Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520.

Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.

Scanlin, L., Arvada, Stone, M., & Collins, F. (2009). *US Patente n° US 7,563,473 B2*.

Segura-Nieto, M., Shewry, P. R., & Paredes-López, O. (1999). *Globulins of the pseudocereals: Amaranth, quinoa, and buckwheat*. In *Seed Proteins*. Dordrecht: Springer .

Shu, G., Zhang, Q., Chen, H., Wan, H., & Li, H. (2015). Effect of five proteases including alcalase, flavourzyme, papain, proteinase k and trypsin on antioxidative activities of casein hydrolysate from goat milk. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 19(2), 65-74.

Silvestre, M. P. (1997). *Review of methods for the analysis of protein hydrolysates*. 60(2), 263-271: Food chemistry.

Singh, D. (2019). *Quinoa (CHENOPODIUM QUINOA WILLD)*. India: Scientific Publishers.

Sousa Jr, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L., Almeida, P. I., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147-153.

Souza, P. M., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P., Silveira, D., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.

Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K. (2015). Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(4), 218-234.

Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31(2), 266-287.

Toapanta, A., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Analysis of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 332-334.

- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437-444.
- Valcárcel-Yamani, B., & Lannes, S. D. (2012). Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public Health*, 2(6), 265-275.
- Valencia, Z., Cámara, F., Ccapa, K., Catacora, P., & Quispe, F. (2017). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua peruana (*Chenopodium quinoa* W.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(1), 16-29.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, C. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 843-849.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M. V., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(5), 2541-2547.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51(1), 75-87.
- Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Yust, M. (2000). Bioactive peptides in storage proteins. *Grasas Acetias*, 51, 361-365.
- Vishwanatha, K. (2009). *Acid protease from Aspergillus oryzae: Structure stability and enhancement of the activity by physical, chemical and molecular biological approaches*. Karnataka, India: PhD. Thesis. Central Food Technological Research Institute.
- Webb, E. (1992). *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. USA: Academic Press.
- Wieczorek, R., Adamala, K., Gasperi, T., Polticelli, F., & Stano, P. (2017). Small and random peptides: an unexplored reservoir of potentially functional primitive organocatalysts. The case of seryl-histidine. *Life*, 7(2), 19.
- Wu, Q., Du, J., Jia, J., & Kuang, C. (2016). Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: Hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study. *Food chemistry*, 199, 140-149.
- Zhang, H., Wang, C., Shen, S., Wang, G., Liu, P., Liu, Z., & Deng, Z. (2012). Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules*, 17(12), 14037-14045.

Zhang, M. N., Huang, G. R., & Jiang, J. X. (2014). Iron binding capacity of dephytinised soy protein isolate hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Journal of food science and technology*, 51(5), 994-999.

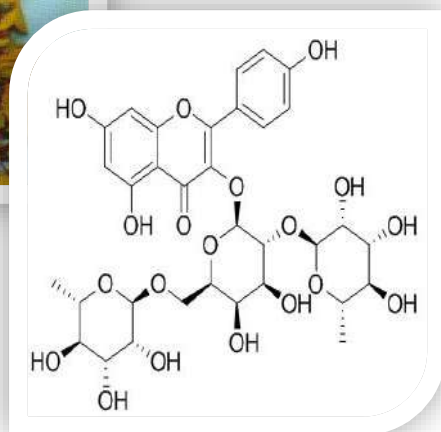
Zhao, X. H., Wang, J. K., & Li, T. J. (2011). In vitro ACE-inhibitory and antioxidant activities of the casein hydrolysates subjected to plastein reaction with addition of three extrinsic amino acids. *Biotechnology*, 10(5), 408-414.

Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.



PARTE II

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITIROFINASA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES FENÓLICAS DE VARIEDADES DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)



2.1. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), es el principal cultivo del oeste de Bolivia, particularmente de las tierras altas del sur de Bolivia. Es resistente a varias plagas y se puede cultivar en condiciones de alto estrés ambiental, como suelos secos, salinos, vientos fuertes y heladas. (Jacobsen, 2011). Además, es un pseudo-cereal con altos beneficios para los humanos, no solo por su importante contenido de proteínas de alta calidad, sino también porque sus granos son ricos en compuestos fenólicos, fibra dietética y minerales, fundamentales en funciones fisiológicas y con propiedades farmacológicas beneficiosas para la salud humana. (Zhu *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2010; Maradini *et al.*, 2017)

Varios compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides, se han informado previamente en granos de quinua. (Zhu *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2010; Maradini *et al.*, 2017; Lin, 2019; Hernández-Ledesma, 2019). Entre los flavonoides identificados en la quinua encontramos los derivados del flavonol que son principalmente derivados glucosídicos de kaempferol y quercetina. (Zhu *et al.*, 2001; Lin, 2019; Hernández-Ledesma, 2019). Los compuestos fenólicos se conocen como moléculas con importantes propiedades bioactivas, particularmente como antioxidantes, moléculas capaces de prevenir o retrasar la oxidación de moléculas capaces de prevenir o retrasar la oxidación de moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. (Maradini *et al.*, 2017). La relación estructura-actividad de los derivados de flavonol aislados de la quinua y su actividad antioxidante, mostró que la capacidad de inhibir los radicales hidroxilos libres aumentó con la cantidad de grupos hidroxilo en el anillo B, por lo que la quercetina es el antioxidante más fuerte entre los flavonoides, sin embargo, los glucósidos del kaempferol son la mayoría en la quinua. El estudio realizado por Zhu *et al.* (2001) mostró una actividad antioxidante moderada por DPPH de cuatro glucósidos de kaempferol, mientras que dos glucósidos de la quercetina mostraron una fuerte actividad antioxidante. Lo que sugiere que la quinua podría representar una fuente importante de inhibidores de radicales libres.

Los estudios sobre compuestos fenólicos han demostrado que pueden tener actividad antitirosinasa (Salleh *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2017). Los inhibidores de la tirosinasa son agentes químicos capaces de inhibir las reacciones enzimáticas que producen el dorado de los alimentos y la melanina en la piel humana. Por lo tanto, estos agentes tienen

un buen potencial comercial tanto en el procesamiento de alimentos como en la cosmética industrial. Los compuestos fenólicos pueden actuar como inhibidores de la tirosinasa a través de grupos hidroxilo que se unen al sitio activo en la tirosinasa, lo que resulta en un impedimento estérico o cambia la conformación. Por lo tanto, los compuestos fenólicos demostraron ser inhibidores efectivos de la actividad de la tirosinasa como se informó anteriormente. (Salleh *et al.*, 2014)

El objetivo de este estudio fue contribuir a evaluar las ventajas nutricionales, cosmeceúticas y de procesamiento de alimentos de las variedades de quinuas bolivianas (tres de la variedad Quinoa Real y la variedad Quinoa Jacha Grano) de gran importancia en el mercado nacional.

2.2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.2.1. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, se encuentran en plantas, alimentos y bebidas derivados de las plantas. Muestran una gran diversidad de estructuras, incluidas moléculas bastante simples (por ejemplo, la vainillina, ácido gálico, ácido cafeico) y polifenoles como estilbenos, flavonoides y polímeros derivados de estos diversos grupos. Por ejemplo, han reportado más de 8000 moléculas, solo en la familia de los flavonoides y la lista continúa expandiéndose. Aunque el término polifenol a menudo se usa como sinónimo de compuesto fenólico, debe restringirse a moléculas que tengan al menos dos anillos fenólicos. Los polifenoles se definieron por primera vez por Bate-Smith y Swain (1962) como “compuestos fenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares entre 500 y 3000 (Da) y además de dar las reacciones fenólicas habituales, tienen propiedades especiales como la capacidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas de la solución”. Más recientemente, se ha propuesto una definición más completa: “El término “polifenol” se debe utilizar para definir metabolitos secundarios de plantas, derivados exclusivamente del fenilpropanoide, derivado del shikimato y/o la ruta(s) del policétido, que presenta más de un anillo fenólico y estar desprovisto de cualquier grupo funcional basado en nitrógeno en su expresión estructural más básica”. (Cheynier, 2012)

El término “fenólico” o “polifenol” puede definirse químicamente con precisión como una sustancia que posee un anillo aromático que lleva un sustituyente hidroxilo (OH), incluyendo

derivados funcionales (ésteres, éteres metálicos, glucósidos, etc.). El fenol en sí mismo es un producto natural, pero la mayoría de los compuestos fenólicos tienen dos o más grupos hidroxilo y se derivan de uno u otro de los fenoles dihidrónicos o trihidrónicos comunes. Se presentan predominantemente como conjugados con azúcares, ácidos glucorónicos o galacturónicos, otros fenoles con menos frecuencia tienen átomos de carbono aromáticos. (Harborne, 1989).

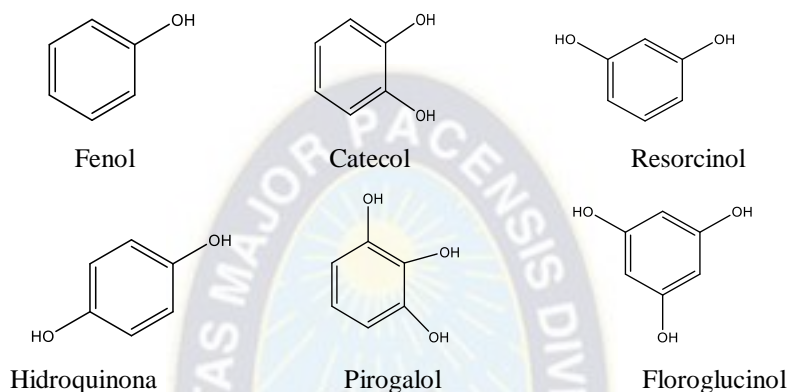


Figura 1.1 Estructura de seis fenoles simples

Fuente: Harborne, 1989

Su producción en los tejidos de las plantas está influenciada por una amplia gama de factores ambientales en respuesta al estrés, incluida la exposición a la radiación UV, el ataque de hongos o bacterias y enfermedades, como consecuencia, se han descrito una serie de funciones fisiológicas y ecológicas en las plantas, incluida la defensa de las plantas, señalización química, protección contra la radiación UV, regulación de hormonas, organogénesis, además de contribuir a su color y sabor. En humanos se ha informado que exhiben una amplia gama de efectos biológicos que incluyen propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y antialérgicas. (Tsang, 2004)

2.2.2. Biosíntesis de Compuestos Fenólicos

Los fenoles naturales de las plantas surgen biogenéticamente de dos vías principales; la vía del shikimato, que proporciona directamente fenilpropanoides tales como los ácidos hidroxicinámicos y cumarinas; y la vía del policétido (acetato), que puede producir fenoles simples (Figura 2.2.) y también muchas quinonas. Por lejos, el grupo más grande de compuestos fenólicos, los flavonoides, se derivan biosintéticamente de una combinación de

estas dos vías. Un esquema del origen de los compuestos fenólicos de las plantas a través del shikimato y fenilalanina se muestra en la Figura 2. 2.

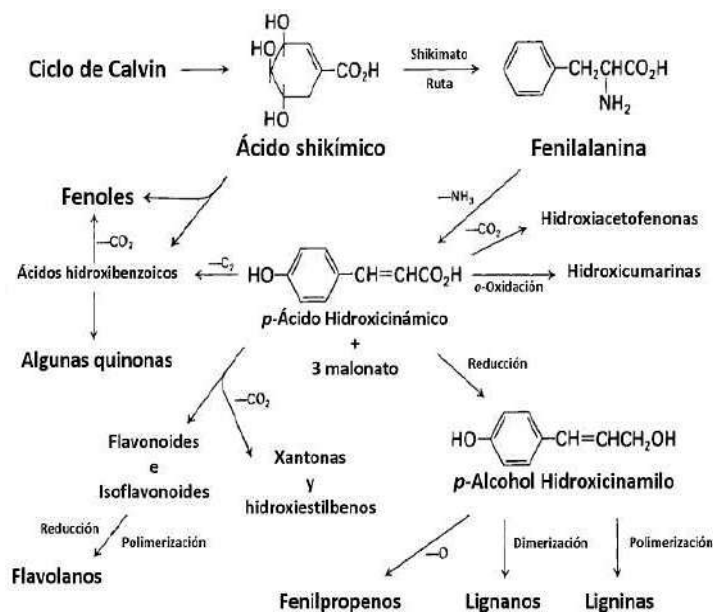


Figura 2.2. Origen biosintético de fenoles de plantas de las vías del shikimato y fenilalanina

Fuente: Harborne, 1989

2.2.3. Clasificación de los Compuestos fenólicos

Desde un punto de vista analítico los compuestos fenólicos pueden dividirse en extraíbles (libres y conjugados) y no extraíbles, formas insolubles principalmente ligadas a polisacáridos de las paredes celulares. Además, han sido clasificados en diferentes grupos de acuerdo a su estructura (número de anillos fenol, tipo y número de elementos estructurales ligados), la cual varía desde moléculas muy simples hasta compuestos altamente polimerizados. En esta clasificación estructural destacan los ácidos fenólicos simples, estilbenos, curcuminoides, chalconas, lignanos, flavonoides e isoflavonas, siendo los ácidos fenólicos y los flavonoides los más ampliamente distribuidos en plantas (frutos, tallos, raíces y granos).

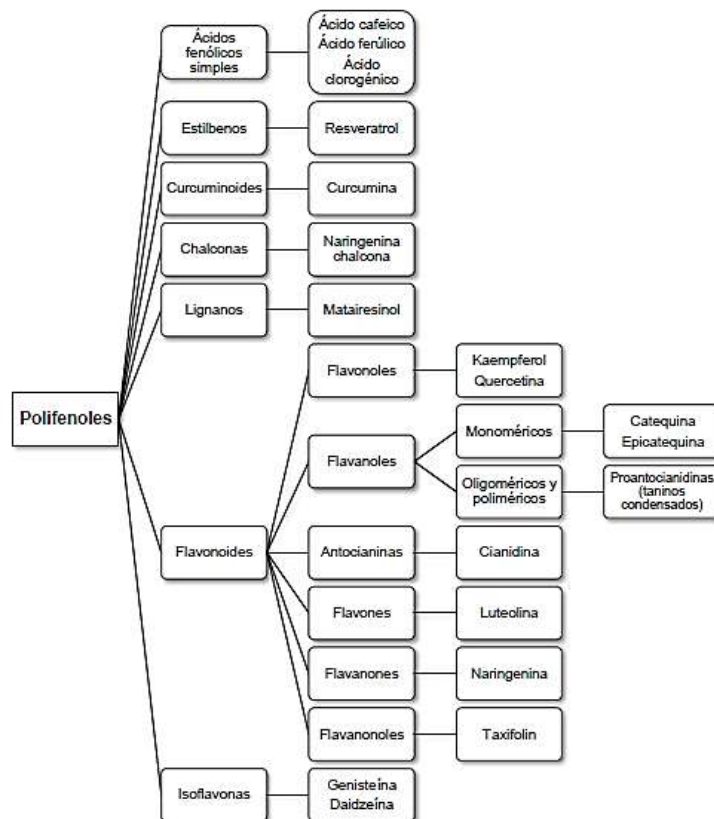


Figura 2.3. Clasificación de los compuestos fenólicos

Fuente: Gonzáles y Rodríguez, 2011

El gran grupo de compuestos fenólicos se puede dividir en dos subgrupos principales: fenoles y polifenoles individuales. A diferencia de los fenoles simples, los polifenoles se caracterizan por la presencia de más de grupos hidroxilo por molécula.

Los *fenoles simples* tienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, sin embargo, también pueden transportar algunos otros sustituyentes, por ejemplo, grupos metoxi.

Los *ácidos fenólicos*, son fenoles simples con un grupo carboxilo.

Los *derivados fenilpropanoicos*, tienen un sistema aromático con 3 cadenas laterales de carbono. A este grupo incluye ácidos cinámicos y sus derivados, cumarinas y lignina. (Dvořáčková, 2014)

2.2.3.1. Flavonoides

Los flavonoides comprenden uno de los grupos más grandes y más dispersos de metabolitos de plantas secundarias con más de 6000 flavonoides identificados hasta la fecha. Los flavonoides existen principalmente en las plantas como glucósidos, mientras que los aglicones (que carecen de restos de azúcar) ocurren con menos frecuencia. Su estructura

común es la de los difenilpropanos que tiene 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6) que consisten en dos anillos de benceno (A y B), que están conectados por un anillo de pirano que contiene oxígeno (C) (Figura 2.4.) (Dvořáčková, 2014)

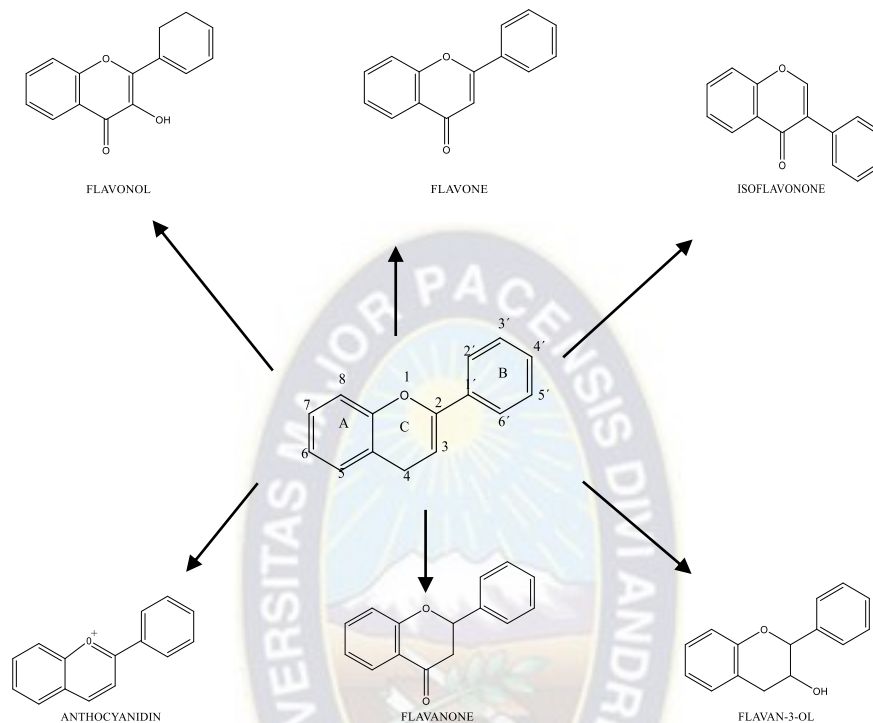


Figura 2.4. Estructuras genéricas de los principales flavonoides
Fuente: Dvořáčková, 2014

Los flavonoides se forman a partir de la combinación de derivados sintetizados a partir de la fenilalanina (a través de la vía del ácido shikímico) y ácido acético; el anillo “A” se forma a partir de tres unidades de acetato (a través de la ruta del ácido malónico) y el anillo “B” con el puente de 3 carbonos, está construido de una unidad de fenilpropano a través de la ruta del ácido shikímico. El primer paso implica la formación de fenilalanina a partir de fenilpiruvato. La fenilalanina se transforma en ácido trans-cinámico, que luego se hidroliza en ácido p -cumárico (C-9). Los ácidos C-9, se condensan con tres unidades de C-2 (malonil-coA) para formar una chalcona de C-15. El posterior cierre del anillo y la hidratación, dan lugar a compuestos, tales, como los 3-hidroxi flavonoides (catequinas) y 3,4-diol flavonoides (flavonoles). Las diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, y, como tales, se subdividen según sus estructuras químicas, en seis clases: flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonoides, antocianinas y flavan-3-oles.

Los flavonoides están presentes en la mayoría de las frutas y verduras comestibles, y se encuentran en una amplia gama de bebidas, incluido el **té** y el **vino tinto**. Las principales fuentes dietéticas y sus flavonoides, se muestran en la Tabla 2.1. (Dvořáčková, 2014)

Tabla 2.1. Las principales fuentes dietéticas de flavonoides

Flavonoide	Fuente de alimento	Contenido de aglicona (mg/kg)
Flavonol		
Quercetina-3, 4'-glucósido	Cebolla	280-490
Quercetina-3-ramnoglucósido	Té negro, grosella negra	10-25, 44
Quercetina-3-galactósido	Manzana	21-72
Miricetina	Judías verdes	30
Kaempferol	Kale	210-470
Flavona		
Luteolina-7-apiosylglucósido	Pimiento rojo dulce	15-39
Apigenina	Apio	15-60
Flavanona		
Hesperitina-7- ramnoglucósido (hesperidina)	Naranja	116-201
Naringenina-7- ramnoglucósido (naringina)	Pomelo	68-302
Flavan-3-oles		
(+)-catequina	Manzana, vino tinto	4-16, 16-53
(-)-epicatequina	Manzana, vino tinto	67-103, 9-42
Procianidinas	Chocolate, vino tinto	165, 22
Antocianinas		
Cianidina-3-glucósido	grosella negra	760
Cianidina-3-rutinosida		
Delfinidina-3-glucósido	grosella negra	590
Delfinidina-3- rutinosida		
Isoflavanonas		
Genisteína-7-glucósido	Frijoles de soya	480
Daidzeína-7-glucósido	Frijoles de soya	330

Fuente: Dvořáčková, 2014

➤ Flavonoles

Los flavonoles están representados principalmente por la miricetina, quercetina, kaempferol e isorhamnetin. La conjugación ocurre más comúnmente en la posición 3 del anillo C, aunque también se producen sustituciones 5, 7, 4', 3' y 5'. Los flavonoles se encuentran comúnmente en una amplia gama de frutas, verduras y bebidas, el flavonol más común en la dieta es la quercetina. La quercetina está presente en varias frutas y verduras, incluido el **té** y el **vino tinto**, pero las concentraciones más altas se encuentran en las **cebollas**. La quercetina está en las plantas en muchas formas glucosídicas diferentes con la quercetina-3-rutinosida, también

llamada quercetina-3-rhamnoglucósido o rutina, siendo una de las formas más extendidas. Otros flavonoles incluyen el kaempferol (**brócoli**), miricetina (**bayas**) e isorhamnetin (**cebolla**). (Dvořáčková, 2014)

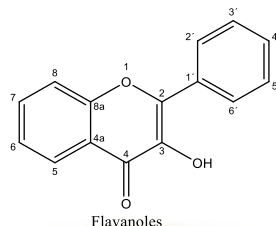


Figura 2.5. Estructura química básica de los flavonoles

Fuente: Elaboración propia

➤ Antocianidinas

Las antocianidinas, tienen una conjugación extendida compuesta de la aglicona de las antocianinas glucósidas, son un grupo de compuestos solubles en agua, responsables de la mayoría de la pigmentación floral, de frutas y hojas en la naturaleza. Estructuralmente las antocianinas consisten en una antocianidina unida a uno o más restos de azúcar, y con un azúcar siempre presente en la posición C3 y frecuentemente en los carbonos 7, 3' y 5'. También pueden formar conjugados con hidroxycinamatos y ácidos orgánicos, como el ácido málico y el ácido acético. Las antocianinas son responsables del color rojo, azul o violeta de las frutas comestibles, incluidas las **uvas**, **ciruelas** y **bayas**, con niveles que aumentan durante la maduración de la fruta. Las antocianidinas más comunes son, la pelargonidina, cianidina, delphinidina y malvidina. (Dvořáčková, 2014)

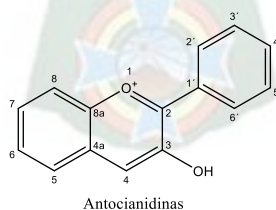


Figura 2.6. Estructura química básica de las antocianidinas

Fuente: Elaboración propia

➤ Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles varían desde los monómeros simples (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, hasta la proantocianidina oligomérica y polimérica, también conocida como taninos condensados. Además de formar complejos con otros flavan-3-oles, se hidroxilan

para formar las galocatequinas y también se esterifican con ácido gálico. Además, se han informado reacciones de metilación, prenilación y O-glicosilación. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina se encuentran en varias frutas y verduras, como **manzanas**, **peras**, **uvas** y **duraznos**, con las concentraciones más altas de catequinas, que se encuentran en el **té** y el **vino tinto**. (Dvořáčková, 2014)

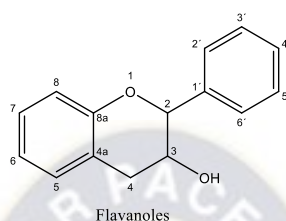


Figura 2.7. Estructura química básica de los flavan-3-oles
Fuente: Elaboración propia

➤ Flavonas

Las flavonas son estructuralmente similares a los flavonoles, sin embargo, carecen de oxigenación en la posición C3. Es posible una variedad de sustituciones que proporcionan una amplia gama de compuestos naturales y sintéticos, estos incluyen hidroxilación, metilación, alquilación y glucosilación. La mayoría de las flavonas se presentan como 7-O-glucósidos. La distribución de flavonas parece estar limitada a unas pocas familias de plantas, siendo las principales flavonas en la dieta, como la apigenina y la luteolina. Se han identificado en el **apio** (apigenina), **pimiento rojo dulce** (luteolina), **perejil** y otras hierbas. (Dvořáčková, 2014)

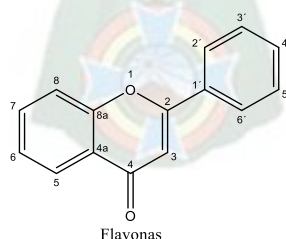


Figura 2.8. Estructura química básica de las flavonas
Fuente: Elaboración propia

➤ Flavanonas

Las flavanonas están representadas principalmente por la taxifolina, naringenina y hesperitina. Las flavanonas se caracterizan por la ausencia del doble enlace C2-C3 y la presencia de un centro quiral en C2. La estructura de la flavanona es altamente reactiva y se

ha informado que experimentan reacciones de hidroxilación, glicosilación y *O*-metilación. La principal fuente dietética de flavanonas son los cítricos y el consumo más común es la hesperitina de las **naranjas**. Naringenina se encuentra en **tomates** y productos a base de tomate. Los tomates frescos, especialmente la piel de tomate, también contienen naringenina, chalcona, que se convierte en naringenina durante el procesamiento en salsa de tomate. (Dvořáčková, 2014)

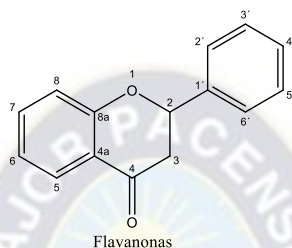


Figura 2.9. Estructura química básica de las flavanonas
Fuente: Elaboración propia

➤ Isoflavanonas

Los isoflavonoides se caracterizan por tener el anillo B, unido en el C3 de la estructura del fenilcromano. Los isoflavonoides se derivan de la vía biosintética y se pueden convertir en una amplia gama de isoflavonoides diferentes, incluidas las isoflavonas, isoflavononas e isoflavonoles. Las isoflavonas están representadas principalmente por daidzen y genisteína. La fuente dietética principal es la **soya** y los productos de soya. Estos compuestos han recibido mucha atención debido a su supuesto papel en la prevención del cáncer de mama y la osteoporosis. (Dvořáčková, 2014)

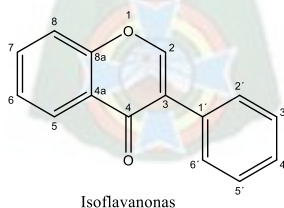


Figura 2.10. Estructura química básica de las isoflavanonas
Fuente: Elaboración propia

2.2.3.2. Compuestos Fenólicos que no son flavonoides

Los principales compuestos que no son flavonoides, se encuentran en la dieta, y son el hidroxibenzoato C_6-C_1 , los hidroxicinamato C_6-C_3 y los estilbenos polifenólicos $C_6-C_2-C_6$. Los ácidos fenólicos existen principalmente como conjugados y rara vez se encuentran en

sus formas ácidas, a menudo se unen a alcoholes, azúcares, polisacáridos o ácidos orgánicos a través de enlaces éster. (Dvořáčková, 2014)

➤ **Hidroxibenzoatos**

Los hidroxibenzoatos también conocidos como ácidos fenólicos incluyen el ácido benzoico y derivados que incluyen ácido salicílico. El ácido gálico es el hidroxibenzoato principal y se sintetiza a partir de fenilalanina a través del ácido 3-deshidroshikimico. Se convierte en ácido elágico y una gama de gallotaninos, con la formación de taninos hidrolizables (polímeros de ácidos gálicos y elágicos). El **té negro** y el **vino tinto** proporcionan ricas fuentes dietéticas de ácido gálico. (Dvořáčková, 2014)

➤ **Hidroxicinamatos**

Los ácidos hidroxicinámicos: los ácidos ρ -cumarico, ferúlico, sinapico, cafeico y sus derivados son la subclase más importante de ácidos fenólicos. El ácido cinámico se produce por la desaminación del aminoácido, fenilalanina, por amoniaco liasa (PAL), y el ácido ρ -cumarico se produce por hidroxilación del ácido cinámico. Además de encontrarse en su forma libre, los hidroxicinamatos también se encuentran esterificados con azúcares, ácidos orgánicos y colina. El ácido cafeico se presenta en los alimentos, principalmente como un éster con ácido quínico o ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico). El **café** es una fuente dietética importante de ácido clorogénico. (Dvořáčková, 2014)

➤ **Estilbenos**

La familia de los estilbenos, tiene una estructura $C_6-C_2-C_6$ y se sabe que son fitoalexinas, una clase de compuestos antibióticos, producidos como parte del sistema de defensa de una planta. El trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxitilbeno) se sintetiza por condensación de 4-cumaril CoA con tres unidades de malonil CoA, cada una de las cuales dona dos átomos de carbono, en una reacción catalizada por el estilbeno sintasa. El resveratrol existe como dos isómeros; cis y trans, generalmente se encuentra como trans-resveratrol-3-O-glucósido, se encuentra en varias familias de tejidos vegetales, como el **eucalipto**, las **uvas**, etc. (Dvořáčková, 2014)

2.2.4. Compuestos Fenólicos en Cereales

Los principales compuestos fenólicos presentes en los granos de cereales, son los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos. (Wang, 2014)

Los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes y pueden proteger contra enfermedades degenerativas en las que están involucradas especies reactivas de oxígeno.

Los antioxidantes fenólicos, como los ácidos fenólicos, pueden modular el estado oxidativo celular y evitar que las moléculas biológicamente importantes como el ADN, las proteínas y los lípidos de la membrana sufran daños oxidativos. Además de las funciones antioxidantes directas, también pueden ejercer algunos efectos en la regulación de las vías de señalización celular, modificando así la regulación génica y/o el estado redox celular. (Wang, 2014)

Todos los alimentos de origen vegetal tienen fenoles, que afectan su apariencia, sabor, olor y estabilidad oxidativa. En los granos de cereales, estos compuestos se encuentran principalmente en el pericarpio, y se pueden concentrar decortizando el grano para producir salvado, que se puede incorporar a un producto alimenticio con mayores niveles de fibra dietética y propiedades nutraceuticas. Las diferentes especies de granos tienen una gran diversidad en sus recursos de germoplasma, que pueden ser explotados. Algunos fenoles son exclusivos de una especie de planta, como las avenantramidas de avena. (Dikes, 2007)

Los ácidos fenólicos (Tabla 2.2.) y los flavonoides están presentes en los cereales en forma libre y conjugada. La concentración más alta de ácidos fenólicos y flavonoides se encuentra en la capa de aleurona de los granos de cereales, pero estos compuestos también se encuentran en embriones y en la cubierta de semillas. Los ácidos fenólicos se encuentran abundantemente en la pared celular y están vinculados a las hemicelulosas en diferentes formas, como 2-*O*-(5'-*O*-(*E*)-feruoyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose. Según Izydorczyk et al., la capacidad de retención de agua de los pentosanos reticulados a través del ácido ferúlico es mayor que la purificada. Se sabe que los ácidos fenólicos contribuyen al potencial antioxidante de los granos de cereales y también se pueden usar para predecir el uso final de los productos de los cereales. Los granos de cereales con niveles elevados de ácidos fenólicos en la cariopsis exhiben una mayor resistencia tanto a las enfermedades como a los insectos, pero exhiben una capacidad de extracción reducida del endospermo. Además, la reticulación de arabinosilanos con ácidos fenólicos disminuye la solubilidad e hinchazón

de arabixonilanos en agua y reduce su degradación microbiana en el ser humano. (Naczki, 2006)

Tabla 2.2. Ácidos fenólicos reportados en granos de cereales

Ácido Fenólico	Grano
Ácidos Hidroxibenzoicos:	
Gálico	Mijo, arroz, sorgo
Protocatecuico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
ρ -Hidroxibenzoico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
Gentísico	Mijo, sorgo
Salicílico	Cebada, sorgo, trigo
Vanílico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
Siringico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
Ácidos Hidroxicinámicos:	
Ferúlico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
Cafeico	Maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo
<i>o</i> -Cumarico	Cebada
<i>m</i> -Cumarico	Cebada
ρ -Cumarico	Cebada, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo
Cinámico	Mijo, sorgo, trigo
Sinapico	Cebada, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo

Fuente: Dykes y Rooney, 2007

Las seis antocianidinas comunes en la naturaleza son, la cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina y peonidina. (Tabla 2.3) (Dikes, 2007)

Tabla 2.3. Flavonoides reportados en granos de cereales

Compuesto	Granos
Antocianinas:	
Apigeninidina	Sorgo
Apigeninidina 5-glucósido	Sorgo
Cianidina	Cebada
Cianidina 3-galactósido	Maíz, trigo
Cianidina 3-glucósido	Cebada, maíz, arroz, centeno, trigo
Cianidina 3-rutinósido	maíz, arroz, trigo
Delfinidina	Cebada
Delfinidina 3-glucósido	Trigo
Delfinidina 3-rutinósido	Arroz, trigo
Luteolinidina	Sorgo
Luteolinidina 5-glucósido	Sorgo
5-Metoxiapigenidina	Sorgo
7-Metoxiapigenidina	Sorgo
7-Metoxiapigenidina 5-glucósido	Sorgo
5-Metoxiluteolinidina	Sorgo
5-Metoxiluteolinidina 7-glucósido	Sorgo
7-Metoxiluteolinidina	Sorgo
Pelargonidina	Cebada
Pelargonidina 3-glucósido	Maíz
Pelargonidina glucósidos	Cebada, maíz

Peonidina-3-glucósido	Maíz, arroz, centeno, trigo
Petunidina 3-glucósido	Cebada, trigo
Petunidina 3-rutinósido	Trigo

Flavonas:

Apigenina	Mijo, avena, sorgo
Apigenina glucósidos	Trigo
Glucosiclorientina	Mijo
Glucosilvitexina	Mijo
Luteolina	Mijo, avena, sorgo
Isovitexina	Avena
Tricina	Mijo, avena, trigo
Vitexina	Mijo, avena

Flavanonas:

Eriodictiol	Sorgo
Eriodictiol 5-glucósido	Sorgo
Homoeriodictiol	Avena
Naringenina	Sorgo

Flavanoles:

Crisoeriol	Cebada
Kaempferol	Maíz, avena
Kaempferol 3-rutinósido	Avena
Kaempferol 3-rutinósido-7-glucurónido	Sorgo
Quercetina	Maíz, avena
Quercetina 3-rutinósido	Avena

Dihidroflavanoles:

Taxifolina	Sorgo
Taxifolina 7-glucósido	Sorgo

Flavan-4-oles:

Apiforol	Sorgo
Luteoforol	Sorgo

Flavanoles (monómeros/dímeros):

Catequina	Cebada, sorgo
Leucocianidina	Cebada, maíz
Leucodelphinidina	Cebada
Leucopelargonidina	Maíz
Procianidina B-1	Sorgo
Procianidina B-3	Cebada
Prodelfinidina B-3	Cebada

Fuente: Dykes y Rooney, 2007

2.2.5. Compuestos fenólicos en Quinua

La quinua posee una gran cantidad de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides. Estos metabolitos desempeñan diversas funciones fisiológicas y ecológicas contra microorganismos, aves e insectos dañinos. También exhiben características beneficiosas para los humanos, como antidiabéticos, anticancerígenos, citotóxicos,

antimicrobianos, actividades antiinflamatorias, inmunorreguladoras y adyuvantes. (Lin, et al., 2019)

2.2.5.1. Análogos del ácido benzoico en Quinoa

Se han identificado al menos 16 análogos del ácido benzoico a partir de la quinoa. Sus actividades biológicas se enumeran en la Tabla 2.4., y las estructuras se muestran en la Figura 2.11.. Los derivados del ácido benzoico, incluido el ácido benzoico (**1**), ácido gálico (**8**), ácido protocatecuico (**10**), ácido siringico (**12**), ácido vanílico (**13**), y sus análogos. Se encuentran en abundancia en hojas y semillas de quinoa. Aunque los análogos del ácido benzoico de la quinoa, no se han sido evaluado por sus actividades biológicas, se ha informado que estos metabolitos de otras especies de plantas tienen actividades antimicrobianas, alelopáticas, antioxidantes y antifederantes (Tabla 2.4.) (Lin, et al., 2019)

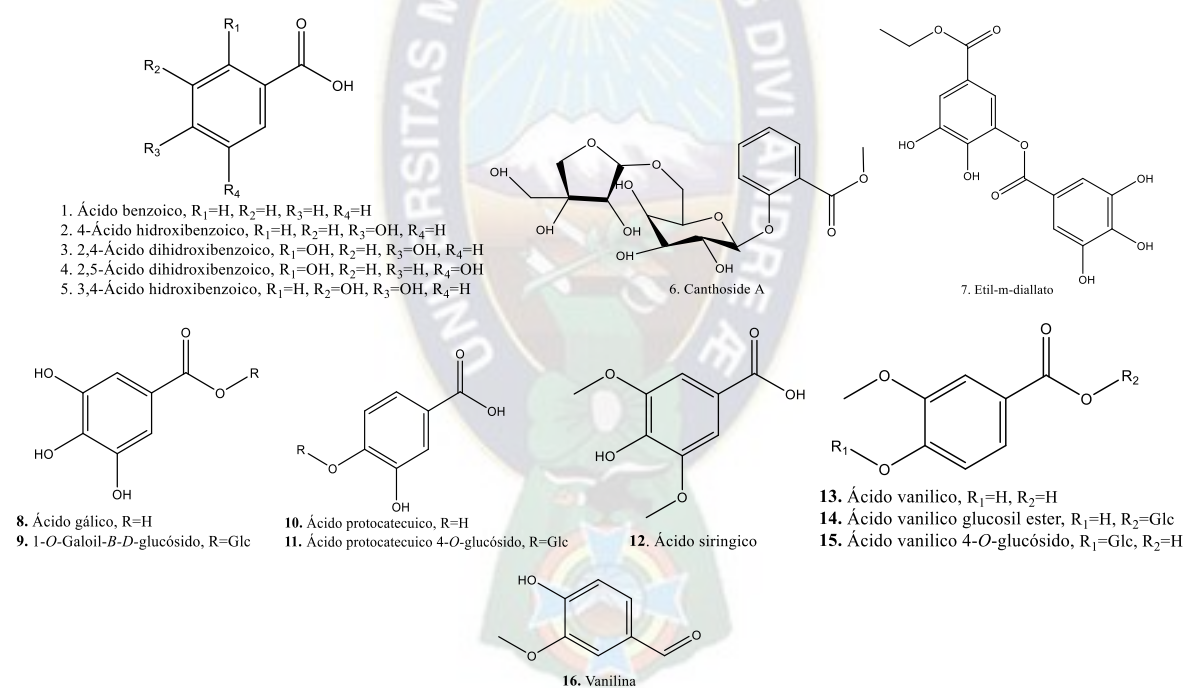


Figura 2.11. Estructuras de los análogos del ácido benzoico aislados de la quinoa

Fuente: Lin, et al., 2019

Tabla 2.4. Análogos del ácido benzoico y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Ácido benzoico (1)	Hojas y harina	
Ácido 4-Hidroxibenzoico (2)	Semillas	Actividad Antimicrobial
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico (2)	Hojas y semillas	Efecto Alelopático
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico (3)	Semillas	
Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico (4)	Semillas	
Ácido 2,4-Dihidroxibenzoico (5)	Semillas	Actividad Antifedante
Canthoside A (6)	Harina	
Etil- <i>m</i> -digalato (7)	Harina	
Ácido gálico (8)	Hojas, tallos y semillas	Actividad Antioxidante Actividad Antibacterial
1- <i>O</i> -Galoi- β -D-glucósido (9)	Semillas y harina	Actividad Antioxidante Actividad Anticáncer
Ácido protocatecuico (10)	Tallos y semillas	Actividad Antibacterial Actividad Antiúlceras Actividad Antienvjecimiento Actividades Antiinflamatorio, Antifibrótico, Antiaterosclerótico, Hiperlipidémico, Analgésico, Hepatoprotector, nefroprotector y Antiviral
Ácido protocatecuico 4- <i>O</i> -glucósido (11)	Harina	Actividad Antioxidante
Ácido siringico (12)	Hojas y semillas	Efecto Alelopático Actividad Antioxidante Actividad Antimicrobial Efecto Hepatoprotector Actividad Antiinflamatorio
Ácido vanílico (13)	Hojas y semillas	Efecto Alelopático Efecto Hepatoprotector Actividades Antioxidantes y Antimicrobianas, y Actividad Inhibitoria en COX-I y COX-II
Ácido vanílico glucosil éster (14)	Semillas	Actividad Antioxidante
Ácido vanílico 4- <i>O</i> -glucósido (15)	Semillas	Actividad Antimicrobial Actividad Antidepresivo
Vanilina (16)	Semillas y harina	Antiangiogénico, Antiinflamatorio y Actividad Antinociceptiva

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.2. Análogos del ácido cinámico en Quinoa

Se han identificado 13 análogos del ácido cinámico a partir de la quinoa. Sus actividades biológicas se enumeran en la Tabla 2.5., y las estructuras se muestran en la Figura 2.12. El

ácido cinámico y sus derivados, son: el ácido cafeico (**17**), ácido clorogénico (**18**), ácido cinámico (**19**), ácido cumárico (**20/21**), ácido ferúlico (**24**), ácido rosmarínico (**28**), ácido sinapínico (**29**) y sus análogos. El ácido ferúlico (**24**) y sus derivados fueron los fenólicos predominantes en forma unida, que están presentes en las semillas de quinua.

Tanto el ácido ferúlico (**24**) como el ácido sinapínico (**29**), tuvieron más efectos fitotóxicos sobre las plántulas de pepino en comparación con los otros ácidos fenólicos probados. Los ácidos fenólicos de la quinua, también fueron aisladas en otras especies de plantas, que mostraron una variedad de actividades biológicas, como actividades antimicrobianas, alelopáticas, antioxidantes, antiapoptóticas, antidiabéticas que se mencionan en la Tabla 2.5. (Lin, et al., 2019)

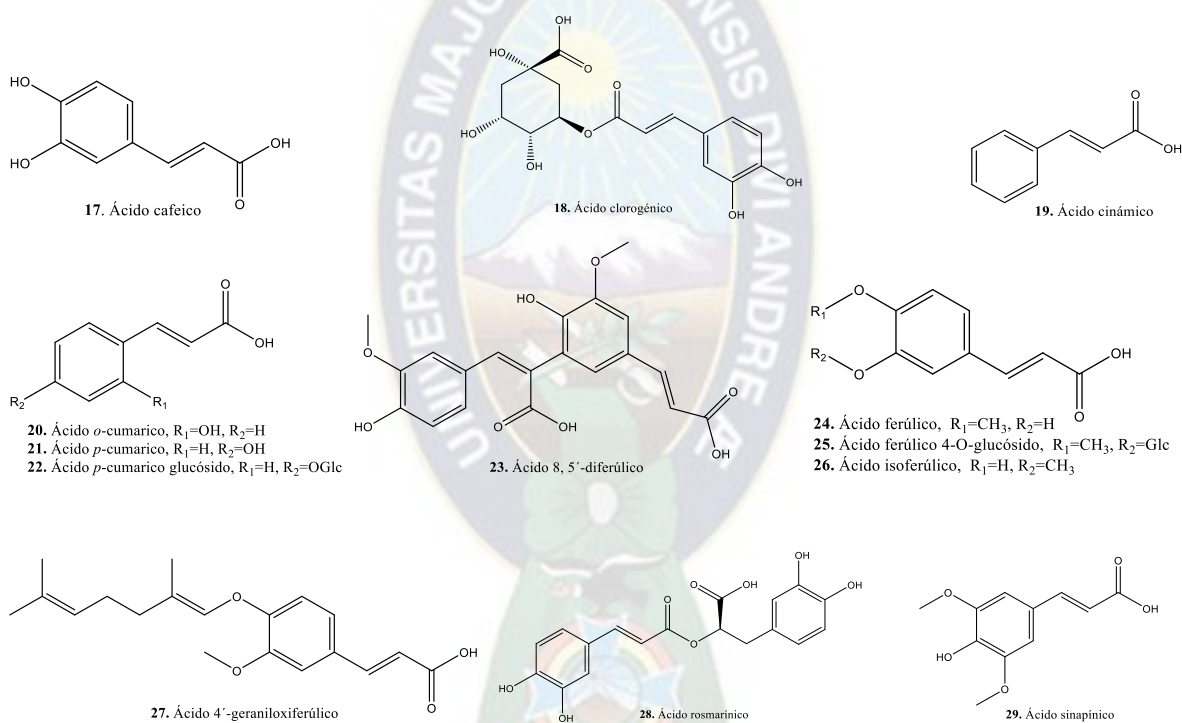


Figura 2.12. Estructuras de los análogos del ácido cinámico aislados de la quinua

Fuente: Lin, et al., 2019

Tabla 2.5. Análogos del ácido cinámico y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Ácido cafeico (17)	Semillas	Actividad Antimicrobial Efecto Alelopático Actividad Antioxidante Actividad Antiapoptótico Actividad Inhibitoria sobre la xantina oxidasa
Ácido clorogénico (18)	Hojas y semillas	Actividad Antimicrobial Actividad Antioxidante Actividad Antidiabético Actividad Hemolítica Efectos Neuroprotectores Actividad Antiobesidad Efecto Antihepatotóxico Actividad Antibiofilm
Ácido cinámico (19)	Tallos y semillas	
Ácido <i>o</i> -cumárico (20)	Hojas y semillas	Efecto Alelopático Actividad Antioxidante
Ácido <i>p</i> -cumárico (21)	Hojas y semillas	Actividad Antilisterial
Ácido <i>p</i> -cumárico glucósido (22)	Semillas	Actividad Antimicrobial
Ácido 8,5'-diferúlico (23)	Semillas	Actividad Antiapoptótico Actividad Antioxidante
Ácido ferúlico (24)	Hojas, tallos y semillas	Actividad Reductora del Colesterol Actividad Antitrombosis Efecto Antiaterosclerosis Actividad Anticáncer Actividades Antiinflamatorio,
Ácido ferúlico 4- <i>O</i> -glucósido (25)	Harina	Actividad Antioxidante
Ácido isoferúlico (26)	Semillas	
Ácido 4'-geraniloxiferúlico (27)	Semillas	Actividad Antioxidante
Ácido rosmarínico (28)	Semillas	Actividad Antimicrobial Actividad Antiinflamatorio Actividades Antimutagenicidad Actividad Antiviral Efectos Antiinflamatorios
Ácido sinapínico (29)	Hojas	Actividad Antioxidante
Ácido trans-sinapínico (29)	Semillas	Efectos de tipo Ansiolítico Efectos de protección cerebral y mejora de la cognición

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.3. Flavonas en Quinoa

Se han identificado 4 flavonas a partir de la quinoa, son: la acacetina (30), isovitexina (31), orientina (32) y vitexina (33). Sus actividades biológicas se enumeran en la Tabla 2.6., y las estructuras se muestran en la Figura 2.13. Las flavonas son significativamente más ricas en los brotes que en otras partes de la quinoa. Los brotes de quinoa cultivados en la oscuridad

contenían vitexina (33) y cantidades sustanciales de isovitexina (31), mientras que los cultivados a la luz del día solo contenían isovitexina (31). La acetina (30), la isovitexina (31), la orientina (32) y la vitexina (33) también se aislaron de otras especies de plantas que mostraron diversas actividades biológicas tales como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, que se enumeran en la Tabla 2.6. (Lin, et al., 2019)

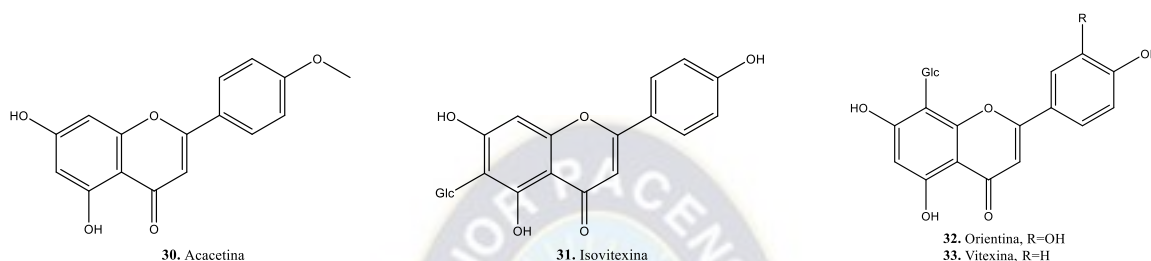


Figura 2.13. Estructuras de las flavonas aisladas de la quinua

Fuente: Lin, et al., 2019

Tabla 2.6. Flavonas y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Acacetina (30)	Harina	Actividad Antioxidante Actividades Espasmolíticas y Antinociceptivas Actividad Antiproliferativo Actividad Anticáncer Actividades Antiinflamatorio y Antinociceptivo Efecto Hipouricémico
Isovitexina (31)	Tallos	Actividades Antioxidante y Antiinflamatorio Efecto Antitumoral Efecto Neuroprotectivo Actividad Anxiolítico Antialzheimer Glucosa sanguínea posprandial reducida Efecto Inhibitorio sobre α -glucosidasa
Orientina (32)	Semillas	Actividad Inhibitoria en la aldosa reductasa sobre el lente de rata Actividad Anticáncer Actividad Antiinflamatorio Actividad Antioxidante Actividades Antiapoptosis Actividades Antitrombótica y Antiplaquetario Actividad Antiproliferativo

Vitexina (33)	Tallos y semillas	Efecto Anticarcinogénico Propiedad Anxiolítico Propiedad Antialzheimer Glucosa sanguínea posprandial reducida Efecto Inhibitorio sobre α -glucosidasa Propiedad de apoptosis inducida Regulación de la contractilidad vascular inducida por agonistas Actividad Antioxidante Efecto Neuroprotectivo Efecto Antidepresivo Efecto Anticonvulsivo Efecto Antiepilectico Efecto Antinociceptivo Antihipoxia/lesión por isquemia Antiisquemia/lesión por reperusión Efecto Antitiroide Actividad Antimicrobial Efecto Antiviral
---------------	-------------------	--

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.4. Flavonoles en Quinua

Se han identificado alrededor de 21 flavonoles en la quinua. La mayoría de ellos están presentes en las semillas. Sus actividades biológicas se enumeran en la Tabla 2.7., y sus estructuras se muestran en la Figura 2.14. El kaempferol (35) como la quercetina (46) son dos flavonoles principales. Están en forma de glucósidos presentes en la quinua. La relación estructura-actividad de su actividad antioxidante, mostró que la capacidad de eliminar los radicales hidroxilos libres aumentó con la cantidad de grupos hidroxilo en el anillo B. La quercetina (46) es el antioxidante más fuerte entre los flavonoides. Tanto la isoramnetina (34) como el kaempferol (35), fueron los flavonoides más abundantes en las hojas de quinua, también contienen grandes cantidades de rutina (54). Mostraron actividad antioxidante moderada, cuatro glucósidos del kaempferol (38-41), mientras que dos glucósidos de la quercetina (50,51) mostraron una fuerte actividad antioxidante, lo que sugiere que la quinua, podría representar una fuente importante de inhibidores de radicales libres.

Muchos flavonoides se caracterizan por actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, no solo contra fitopatógenos, sino también contra los patógenos para humanos y animales (Tabla 2.7.). El kaempferol (35) y sus derivados, mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como también contra el hongo *Candida glabrata*. Se han identificado alrededor de ocho derivados de quercetina (46-53) en la quinua. El kaempferol (35), la miricetina (45) y la quercetina (46) actuaron como

elementos de disuasión contra *Radopholus similis* y *Meloidogyne incognita*. El 3-*O*-glucósido de quercetina (**47**) y la rutina (**54**) de *Pinus banksiana* inhibieron el desarrollo de *Lymantria dispar* inhibieron y aumentaron su mortalidad. La quercetina (**46**), la quercetina 3-*O*-glucósido (**47**) y sus seis derivados exhibieron actividad inhibitoria en el crecimiento de brotes de *Arabidopsis thaliana*, así como en la germinación de esporas del hongo *Neurospora crassa*. (Lin, et al., 2019)

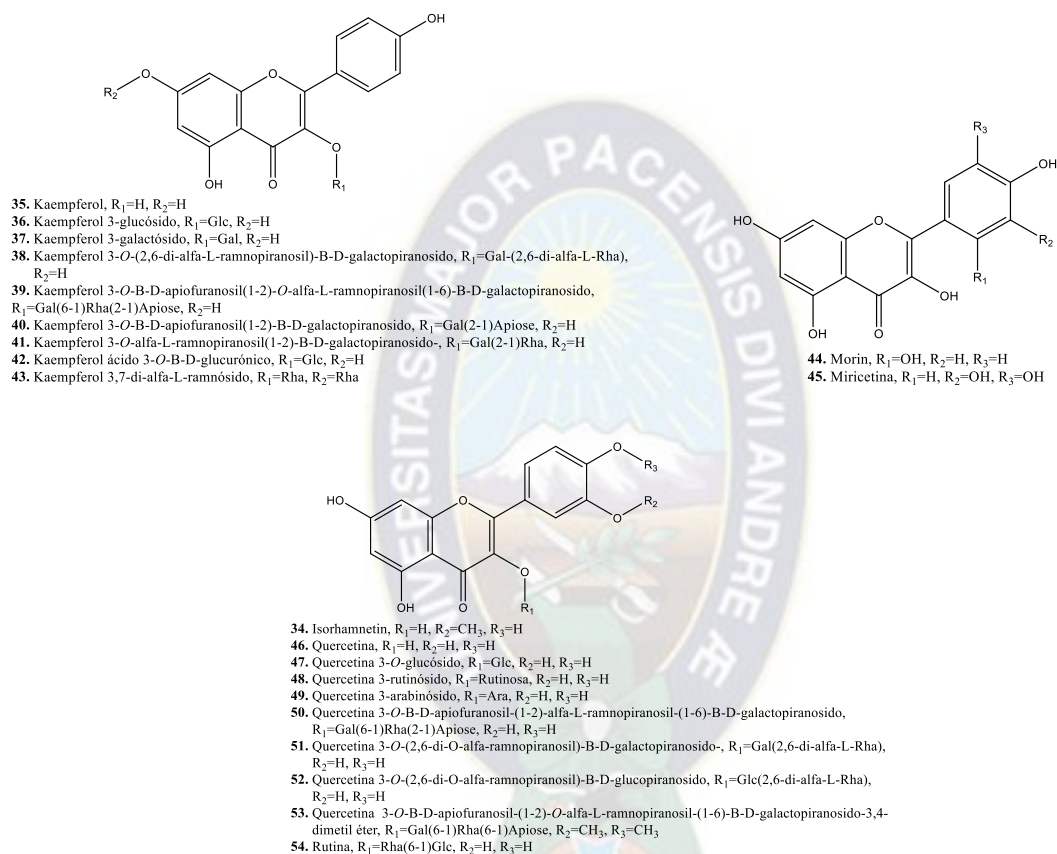


Figura 2.14. Estructuras de los flavonoles aislados de la quinua
Fuente: Lin, et al., 2019

Tabla 2.7. Flavonoles y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Isorhamnetin (34)	Hojas	Actividad Actividades Antituberculosis Actividad Antiinflamatorio Actividad Antioxidante Actividad Antitumoral Actividad Anticoagulante
Kaempferol (35)	Semillas	Actividades Antioxidante y Antiinflamatorio Efecto Antitumoral Efecto Neuroprotectivo Actividad Anxiolítico Antialzheimer Glucosa sanguínea posprandial reducida Efecto Inhibitorio sobre α -glucosidasa Actividad Inhibitoria en la aldosa reductasa sobre el lente de rata
Kaempferol 3-glucósido (36)	Semillas	
Kaempferol 3-galactósido (37)	Semillas	
Kaempferol 3- <i>O</i> -(2,6-di- α -ramnopiranosil)- β -D-galactopiranosido (38)	Semillas	
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosido (39)	Semillas	
Kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosido (40)	Semillas	Actividad Antioxidante
Kaempferol 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosido (41)	Semillas	
Kaempferol ácido 3- <i>O</i> - β -D-glucurónico (42)	Semillas	
Kaempferol 3,7-diramnósido (43)	Semillas	Actividad Antibiofilm Actividad Antiinflamatorio Actividad Antitumoral
Morin (44)	Tallos y semillas	Efecto Inhibitorio en la expresión de α 1 (I) colágeno Actividad Antioxidante Actividad Anticáncer Efecto Neuroprotectivo Actividad Hepatoprotectivo
Miricetina (45)	Semillas	Actividad Antibacterial Actividades Antioxidante y Prooxidante Actividad Anticáncer Actividad Antiinflamatorio Actividad Analgésico

Quercetina (46)	Hojas y semillas	Actividad de Inhibición de COX-1 y COX-II Actividades Antioxidante y Prooxidante Actividad Antiinflamatorio Actividad Citotóxica
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido (47)	Harina	
Quercetina 3-rutinósido (48)	Semillas	Actividad Antioxidante
Quercetina 3-arabinósido (49)	Semillas	
Quercetina 3- <i>O</i> -β-D-apiofuranosil-(1→2)-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosido (50)	Semillas	
Quercetina 3- <i>O</i> -(2,6-di-α-L-ramnopiranosil)-β-D-galactopiranosido (51)	Semillas	
Quercetina 3- <i>O</i> -(2,6-di- <i>O</i> -α-ramnopiranosil)-β-glucopiranosido (52)	Semillas	
Quercetina 3- <i>O</i> -β-D-apiofuranosil-(1→2)- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosido-3,4-dimetil éter (53)	Semillas	
Rutina (54)	Hojas, tallos y semillas	Actividad Antidiabético Actividad Antioxidante Actividad Antiulcerogénico

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.5. Flavanonas en Quinua

Se identificaron 3 flavanonas en semillas de la quinua, como ser hesperidina (55) neohesperidina (56) y naringina (57) (Tabla 2.8. y Figura 2.15.). Tanto la hesperidina (55) como la neohesperidina (56) se encontraron en los brotes. Estas flavanonas aisladas de otras especies de plantas, se seleccionaron para mostrar una variedad de actividades biológicas tales como actividades neuroprotectoras, antioxidantes, antiinflamatorias y antifúngicas. (Lin, et al., 2019)

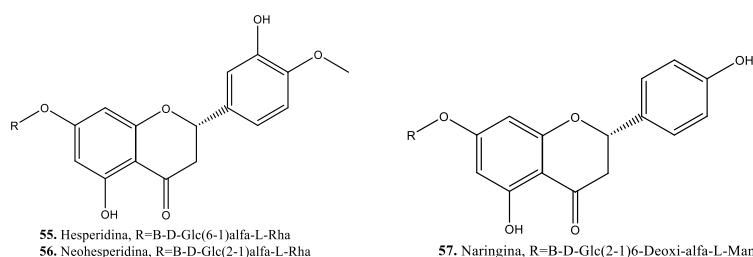


Figura 2.15. Estructuras de los flavanonas aisladas de la quinua

Fuente: Lin, et al., 2019

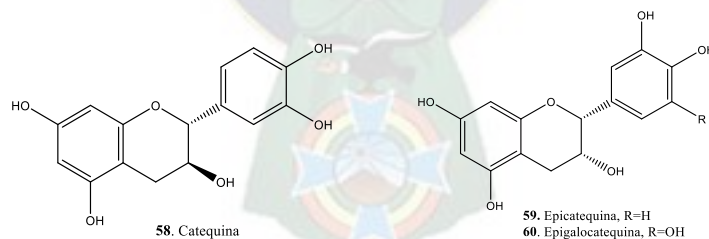
Tabla 2.8. Flavanonas y sus actividades biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Hesperidina (55)	Semillas	Efecto Neuroprotector Actividades Antioxidante y Citotóxica Actividad Antiinflamatoria Actividad Anticáncer Actividad Antifúngica Actividades Antiproliferativa y Apoptótica Protege el hígado contra lesiones inducidas por drogas
Neohesperidina (56)	Semillas	Actividad Cardioprotectora Efecto Neuroprotector Actividad Antifúngica Actividad Antioxidante Induce la apoptosis celular
Naringina (57)	Semillas	Actividad Antifúngica Actividad Antiinflamatoria Actividad Antioxidante Actividades Antiosteoporosis

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.6. Flavonoles en Quinoa

Se encontraron 3 flavanoles; catequina (58), epicatequina (59) y epigalocatequina (60) en las semillas de quinoa. Sus actividades biológicas se enumeran en la Tabla 2.9. y sus estructuras se muestran en la Figura 2.16. En general, mostraron actividades antioxidantes y antimutagénicas.

**Figura 2.16.** Estructuras de los flavanoles aislados de la quinoa

Fuente: Lin, et al., 2019

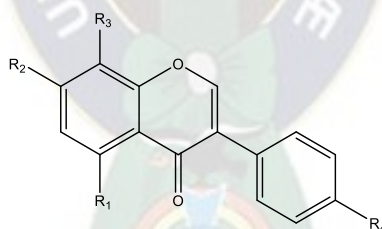
Tabla 2.9. Flavonoles y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Catequina (58)	Semillas	Actividad Antioxidante Actividad Antimutagénico Actividad Antimetastásico Actividad Antifúngico Actividad Inductora de apoptosis
Epicatequina (59)	Semillas	Actividad Antimutagénico Actividad Antiproliferativo Actividad Antioxidante
Epigallocatequina (60)	Semillas	Actividad Antioxidante

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.5.7. Isoflavonas en Quinoa

Se encontraron 5 isoflavanonas, como ser: biocanina (61), daidzeína (62), genisteína (63), prunetina (64) y puerarina (65) en la quinoa (Tabla 2.10. y Figura 2.17). Mostraron actividades antinematodales en *Radopholus similis*. Se reconoce que las isoflavanonas son compuestos estrogénicos que a menudo se asocian con un riesgo reducido de cáncer. La actividad estrogénica puede potenciarse después de la metabolización a compuestos más activos como la daidzeína (62) y la genisteína (63) por microorganismos intestinales.



61. Biocanina A, R₁=OH, R₂=OH, R₃=H, R₄=OCH₃
 62. Daidzeína, R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=OH
 63. Genisteína, R₁=OH, R₂=OH, R₃=H, R₄=OH
 64. Prunetina, R₁=OH, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=OH
 65. Puerarina, R₁=OH, R₂=OH, R₃=Glc, R₄=OH

Figura 2.17. Estructuras de las isoflavanoides aislados de la quinoa

Fuente: Lin, et al., 2019

Tabla 2.10. Isoflavonas y sus actividades o funciones biológicas

Nombre	Parte de la Quinoa utilizada para aislamiento	Actividad o Función Biológica
Biocanina A (61)	Semillas	Actividad Antioxidante
Dadzeína (62)	Semillas	Mejora la diferencia de adipocitos y actividades transcripcionales PPAR γ Afecta a las células de cáncer de cuello uterino, no dependiente de hormonas humanas Modula la actividad contráctil uterina de rata <i>in vitro</i> Actividad Antihipoxia Actividades Antitrombótico y Antialérgico Actividad Quimio protector Inhibe la pérdida ósea en ratones ovariectomizados Actividad Antiproliferativa
Genisteína (63)	Semillas	Actividad Antiproliferativa en células cancerosas de respiración humana Modula la actividad contráctil uterina de rata <i>in vitro</i> Actividad Antioxidante Actividad Inhibitoria sobre proteínas quinasas específicas de tirosina Actividad Antitumoral Actividades Anticáncer y Citotóxica Actividad Antiangiogénico Actividad Antibacterial Inhibición de la actividad de la 2-ciclooxigenasa Actividad contra el cáncer de próstata Actividad Antileucémica Inducción de la actividad quinona reductasa Induce la detención del crecimiento y suprime las actividades de telomerasa
Prunetina (64)	Semillas	Actividad Antiinflamatoria
Puerarina (65)	Semillas	Actividades Antitrombótico y Antialérgico Actividad Antiapoptosis Efecto Antihiper glucémico

Fuente: Lin, et al., 2019

2.2.6. Actividad Antitirosinasa

2.2.6.1. Tirosinasa

La tirosinasa o polifenol oxidasa (Figura 2.22) es una enzima multifuncional que contiene cobre que prevalece en las plantas que prevalece en las plantas y el reino animal. Es una enzima reguladora clave que influye enormemente en el proceso de melanogénesis dentro de los melanocitos. La melanina, es una mezcla de diferentes biopolímeros, determina el color de la piel y el cabello, además de brindar protección contra la dañina radiación UV. La

tirosina se cataliza como un precursor común de la quinona, que se utiliza para la síntesis del pigmento de melanina. Por lo tanto, la sobreproducción y acumulación de pigmentos de melanina en la piel, conduce al desarrollo de “hiperpigmentación” dermatológica en condiciones clínicas, como lentigo solar, melasma, hiperpigmentación posinflamatoria (PIH) y línea negra. También puede ocurrir debido al desequilibrio hormonal en el cuerpo, es decir, la enfermedad de Cushing, la enfermedad de Addison y el Síndrome de Nelson. (Biswas, 2016)

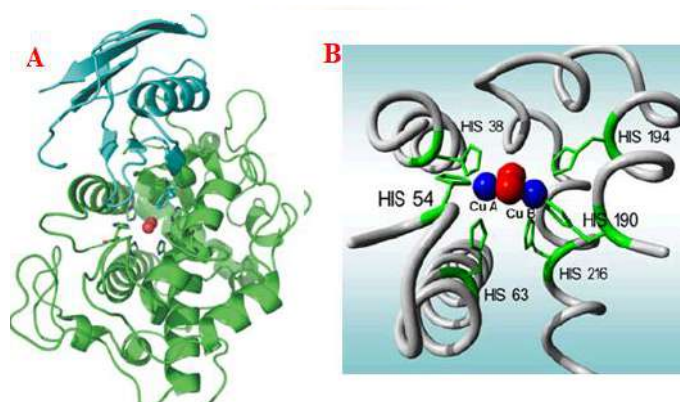


Figura 2.22. A) Estructura terciaria de la tirosinasa; B) Sitio activo de la tirosinasa
Fuente: Enguita, 2011

2.2.6.2. Inhibidores de la Tirosinasa

Se han aislado e identificado un gran número e identificado un gran número de inhibidores tanto de fuentes naturales como sintéticos. Muchos de estos inhibidores se estudian utilizando tirosina/dopa como sustratos y la actividad enzimática se sigue midiendo la formación de dopacromo. Así pues, la inhibición de tirosinasa puede ser clasificada, desde un punto de vista experimental, en diferentes tipos:

1. Agentes reductores que producen la reducción de *O*-dopaquinona a L-dopa. En este tipo se encuentran inhibidores clásicos como ácido ascórbico, que se utiliza como inhibidor de la melanogénesis ya que, al reducir la *O*-dopaquinona, impide la formación de dopacromo y, por tanto, la formación de melaninas.
2. Eliminadores de *O*-dopaquinona, que reaccionan también con ésta y forman compuestos coloreados. En este tipo destacan los compuestos tiólicos como la cisteína, que forma un aducto con la *O*-quinona y ralentiza el proceso de formación de eumelaninas hasta que el compuesto tiólico es consumido.

3. Sustratos enzimáticos alternativos. En este tipo están los compuestos fenólicos cuyo producto quinónico absorbe en una longitud de onda diferente a la del dopacromo. Cuando la enzima tiene una buena afinidad por estos compuestos la formación de dopacromo disminuye y, son clasificados erróneamente como inhibidores de la enzima.
4. Inactivadores enzimáticos no específicos. En este tipo se encuadran los ácidos y bases, los cuales desnaturalizan inespecíficamente a la enzima inactivándola.
5. Inactivadores específicos de tirosinasa. Estos son los inhibidores basados en el mecanismo de la enzima, entre los que destacan los sustratos suicidas. Estos compuestos actúan irreversiblemente sobre la enzima induciendo su inactivación suicida.
6. Inhibidores específicos de tirosinasa. Son aquellos inhibidores que se unen reversiblemente a la enzima reduciendo su actividad catalítica.

2.2.7. Antioxidantes

Un antioxidante es “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato. Halliwell (2007), informó que un antioxidante es “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula objetivo. Los antioxidantes son inhibidores del proceso de oxidación, incluso en concentraciones relativas pequeñas y, por lo tanto, tienen un papel fisiológico diverso en el cuerpo. Los componentes antioxidantes del material vegetal actúan como eliminadores de radicales y ayudan a convertir los radicales en especies menos reactivas. Se encuentran una variedad de antioxidantes que eliminan los radicales libres, se pueden encontrar en frutas, verduras, té, etc. (Yadav *et al.*, 2016)

Los antioxidantes y los radicales libres son perjudiciales para la salud del cuerpo cuando su sobrecarga no puede destruirse de manera constante y, en consecuencia, generan una ocurrencia llamada **estrés oxidativo**. Este curso de acción que ocurre debido a la producción desproporcionada de radicales libres y antioxidantes juega un papel clave en la formación y desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, la artritis reumatoide, los trastornos cardiovasculares y autoinmunes o incluso el envejecimiento. Uno de los efectos nocivos del

estrés oxidativo es su papel en la inducción del daño celular y la alteración de sus funciones regulares, específicamente para ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. (Goodarzi *et al.*, 2018) Los radicales libres dañinos, se dividen ampliamente en dos tipos: especies reactivas de oxígeno (**ROS**) y especies reactivas de nitrógeno (**RNS**). ROS incluye tanto radicales de oxígeno como ciertos radicales que son agentes oxidantes o que pueden convertirse fácilmente en radicales. RNS es también un término colectivo que incluye radicales de óxido nítrico y dióxido de nitrógeno. (Gupta, 2014)

2.2.7.1. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes de acuerdo a su origen se clasifican en dos grandes grupos: antioxidantes sintéticos y antioxidantes naturales (Figura 2.18.) (Gallego, 2016)

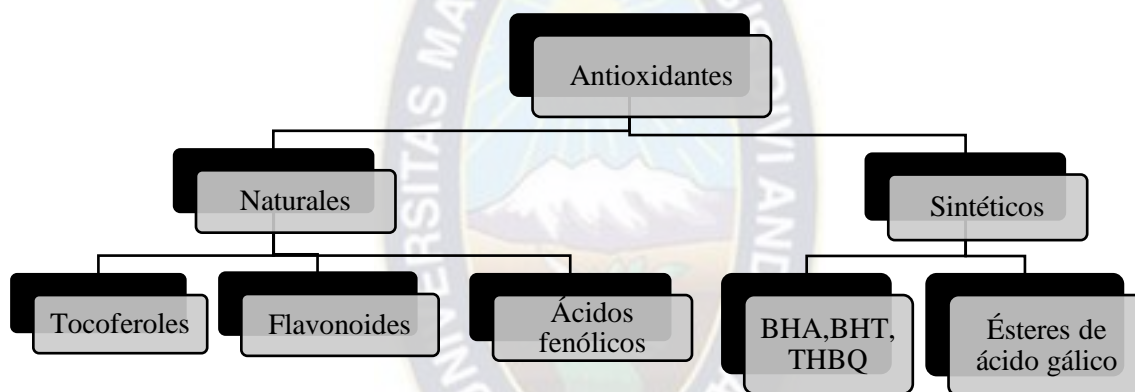


Figura 2.18. Esquema de clasificación de los antioxidantes

Fuente: Gallego, 2016

➤ Flavonoides como antioxidantes

Los flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C. Los sitios de unión propuestos para metales trazas a flavonoides, como se destaca en la Figura 2.19.a es la parte catecol en el anillo B, los 3 grupos hidroxilo, 4-oxo en el anillo heterocíclico y los grupos 4-oxo, 5-hidroxilo entre el heterocíclico y el anillo A. La principal contribución a la actividad de quelación de metales de los flavonoides se debe al resto catecol. Debido a sus potenciales redox más bajos (0.23-0.75 V), los flavonoides son termodinámicos y pueden reducir los radicales libres, altamente oxidantes con potenciales redox en el rango de 1.0-2.13 V, como los radicales superóxido, peróxido, alcoxilo e hidroxilo por donación de átomos de hidrógeno. (Gupta, 2014)



El radical aroxilo $\text{ArO} \cdot$ Puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura de quinona estable como se indica en la Figura 2.19.b. Las características estructurales y la naturaleza de las sustituciones en los anillos B y C determinan la actividad antioxidante de los flavonoides. (Gupta, 2014)

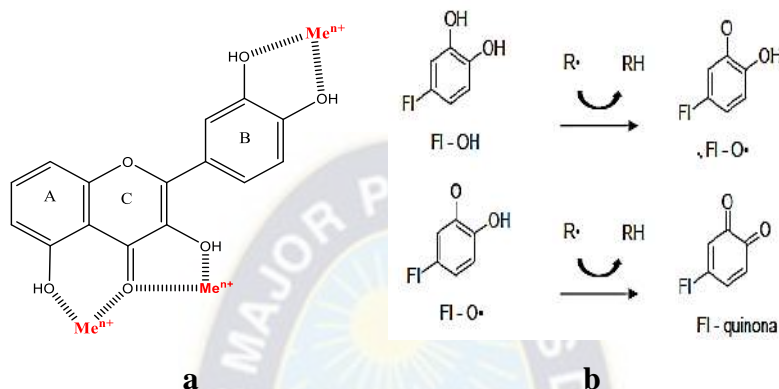
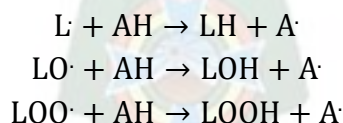


Figura 2.19. a) Sitios de unión con metales de los flavonoides, b) Potencial antioxidante de los fenólicos
Fuente: Gupta, 2014

2.2.7.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante, debemos referirnos a términos específicos de oxidantes como “capacidad de eliminación de radicales peroxi”, “capacidad de eliminación de superóxido”, “capacidad de reducción de iones férricos”, etc. Los antioxidantes se han dividido en dos clases; antioxidantes primarios o los que rompen cadenas, y antioxidantes secundarios o preventivos. (Gupta, 2014)

Los mecanismos de **ruptura de la cadena** están representados por:



Donde, L \cdot significa radical lipídico y AH representa un antioxidante.

Los antioxidantes secundarios o preventivos retrasan la velocidad de oxidación. Los metales activos redox como el hierro (Fe), el cobre (Cu), el cromo (Cr), el cobalto (Co) y otros metales experimentan reacciones de ciclo redox y poseen la capacidad de producir radicales reactivos como el radical anión superóxido y el óxido nítrico en sistemas biológicos. (Gupta, 2014)

2.2.8. Determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales mediante el Método Folin-Ciocalteu (FC)

El ensayo con Folin-Ciocalteu (FC) inicialmente fue empleado para la cuantificación de tirosinasa en proteínas, pero con el tiempo fue modificado para poder analizar compuestos polifenólicos en distintos tipos de extractos vegetales. (Muñoz, et. al, 2017)

El método está basado en la oxidación de los fenoles, por un reactivo de molibdeno y wolframio. En donde el método introducido por Folin y Ciocalteu el cual se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado utiliza una mezcla de ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) y fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) de color amarillo comúnmente denominado “reactivo de FC. Se reduce por oxidación de los fenoles a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}) (Figura 2.20.) (Resat, et al.,2007)

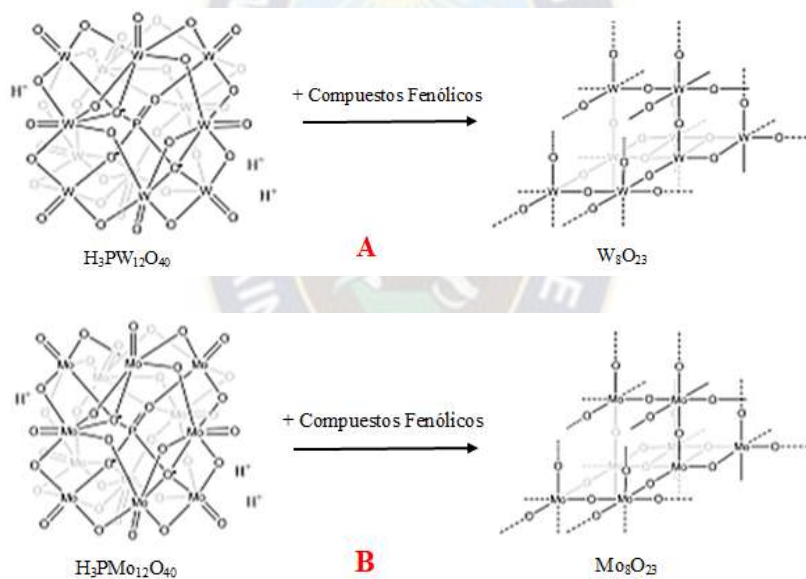


Figura 2.20. Reacciones específicas del reactivo de Folin-Ciocalteu con compuestos fenólicos: A. entre ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y compuestos fenólicos; B. entre ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) y compuestos fenólicos.

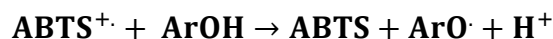
Fuente: Bancuta, et al., 2016

La reacción se lleva a cabo en condiciones básicas con la finalidad de que se genere un ion fenolato que reduce al FC mediante una reacción de tipo óxido/reducción y genera la formación de un complejo de Mo(V) que presenta una coloración azul cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 765 nm. (Muñoz, et. al, 2017)

La absorbancia del color azul desarrollada es proporcional a las tasas de compuestos fenólicos. El fundamento de dicha reacción está basado en la habilidad de los compuestos fenólicos de auto-oxidarse con el fin de reducir la mezcla de ácidos fosfotúngstico/fosfomolibdico a un complejo azul, que presenta un máximo de absorción a 765 nm y se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico.

2.2.9. Método ABTS

Este ensayo requiere 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), que en el tratamiento con persulfato de sodio/potasio o MnO_2 , da un catión radical de color verde azulado ($\text{ABTS}^{\cdot+}$). El catión radical se obtuvo haciendo reaccionar el stock de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2,45 mM y permitiendo que la mezcla permanezca en la oscuridad durante 12-16 h antes de su uso. El catión radical se reduce en presencia de antioxidantes que donan hidrógeno (compuestos lipofílicos e hidrofílicos y extractos alimenticios, incluidos flavonoides, hidroxicinamatos y carotenoides). El catión radical muestra máximo de absorción a una longitud de 734 nm. Trolox puede usarse como antioxidante estándar. Las influencias tanto de la concentración de antioxidante como de la duración de la reacción sobre la inhibición de la absorción de cationes radicales se pueden tener en cuenta al determinar la actividad antioxidante. Este método es mejor que el ensayo original de capacidad antioxidante equivalente de Trolox. En primer lugar, se realiza la generación directa de un catión radical ABTS sin la participación de un radical intermediario, de ahí la solución madre de $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Es estable durante muchos meses en el refrigerador. En segundo lugar, el catión radical se forma previamente antes de la adición de los sistemas de prueba de antioxidantes. En tercer lugar, es aplicable tanto a los sistemas lipofílicos como a los hidrofílicos. (Gupta, 2014)



El $\text{ABTS}^{\cdot+}$, catión radical de color azul, absorbe la luz a 734 nm. La Figura 2.21. indica la reacción de transferencia de electrones en $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Cuando se prueban sustancias usando este ensayo, los perfiles cinéticos deben examinarse primero antes de determinar los puntos finales. (Gupta, 2014)

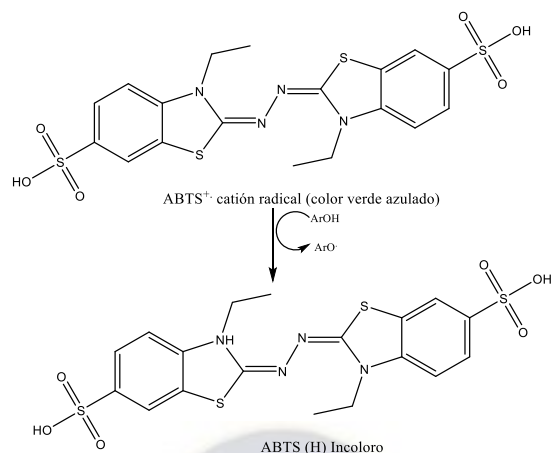


Figura 2.21. Radical ABTS (azul) abstrayendo H^+ de ABTS(H) (incoloro)
Fuente: Gupta, 2014

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener extractos con compuestos fenólicos de las variedades de quinua (Quinua Real Blanca, Quinua Real Negra, Quinua Real Roja y Quinua Jacha Grano).
- ✓ Aislar e identificar el flavonoide mayoritario a partir de la Quinua Jacha Grano.
- ✓ Cuantificar el flavonoide mayoritario en los extractos de las variedades de quinua.
- ✓ Evaluar la actividad antitirosinasa *in vitro* en los extractos, fracciones ricas en compuestos fenólicos y el flavonoide mayoritario.
- ✓ Cuantificar los compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu, en los extractos, fracciones ricas en compuestos fenólicos y el flavonoide mayoritario.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante por el método ABTS de los extractos, fracciones ricas en compuestos fenólicos y el flavonoide mayoritario.

2.4. PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1. Materiales, equipos y reactivos

2.4.1.1. Materiales

- Balón de fondo redondo 250, 500 y 1000 mL
- Columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich)
- Espátula
- Embudo buchner

- Filtro PTFE 0.2 μm
- Kitasato 500 y 1000 mL
- Magnetos
- Matraz aforado de 500, 1000 y 2000 mL
- Membrana de filtro (Millipore®, 47 mm)
- Micropipeta Variable 10-100 μL (SOCOREX, Acura 825)
- Micropipeta Variable de 100-1000 μL (SOCOREX, Acura 825)
- Microplaca de 96 pocillos
- Papel Whatman N°4
- Parafilm
- Pinzas de Laboratorio
- Pinzas metálicas
- Piseta de 500 mL
- Placa Petri
- Placas TLC (Merck, Silicagel 60 F₂₅₄,)
- Probeta de 100 y 1000 mL
- Soporte universal
- Tamiz de 250 μm (No. 60) (Retschun-ASTM E11)
- Tips para micropipeta de 100 y 1000 μL
- Tubos de centrifugación de 10 mL
- Tubos de ensayo de 5 mL
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 2000 mL
- Viales de vidrio de 2, 4 y 10 mL
- Vortex

2.4.1.2. Equipos

- Agitador magnético (Cat.-M6)
- Balanza analítica (Precisa-XT 120A)
- Bomba de vacío (Vacumbrand-ME2C)
- Centrifugadora (PowerSpin™-LX CENTRIFUGE)

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) preparativo, Shimadzu, columna Restek Ultra C18 (100 x 10 mm) 5 µm, detector UV-visible (190-700 nm) SPD – 20 A, la bomba es isocrática (LC-20AP) acoplado a un colector de fracciones.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), Agilent 1100, que comprende un desgasificador vacío (G1322), un sistema de bomba cuaternario (Quat Pump-G1311A), un horno de columna (Colcom-G1316A), un horno de columna eclipse de fase reversa Agilent plus C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm protegida por una precolumna de 10 mm., detector DAD (190-950 nm).
- Equipo de Extractor Soxhlet
- Estufa Universal (Memmert-UN55)
- Filtro de agua (Millipore®)
- Lector multiplacas (BIOTEC)
- Liofilizador (BIOBASE-BK FD18P)
- Moedor-dosificador de granos (La Pavoni S.p.A.-Zip)
- pH metro (Thermo Scientific™ Orion Star-A120)
- Placa calefactora con agitador magnético (Heidolph™ MR)
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Bruker de 300 MHz)
- Rotaevaporador (Heidolph-Laborota 4011 digital)
- Sistema de reflujo

2.4.1.3. Reactivos

- 1-Butanol 99.89 % (J.T.Backer)
- 2,2'-Azino-bis (Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 98 % (Sigma-Aldrich)
- Acetato de etilo q.p. (destilado en el laboratorio)
- Acetonitrilo 99,9 % (HPLC) (Sigma-Aldrich)
- Ácido bórico 99.5 % (Promega)
- Ácido clorhídrico 36.5-38.0 % (J.T. Baker®)
- Ácido gálico anhidro 98.0 % (Merck)
- Ácido kójico 98.5 % (HPLC) (Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico 95.0 – 98.0 % (J.T.Backer)
- Agua destilada

- Agua Ultra purificada MilliQ
- Alcohol etílico 96° q.p. (destilado en el laboratorio)
- Cloruro de sodio 99.0 % (Sigma-Aldrich)
- Éter de petróleo fracción 40-60°C q.p. (destilado a partir de la gasolina)
- Éter de petróleo, fracción 40-60°C (destilado a partir de la gasolina)
- Folin – Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio 98.0 % (MACRON)
- Metanol 99,8 % (HPLC) (Sigma-Aldrich)
- Ninhidrina monohidratado 99,0%, (J.T.Backer)
- Sodio Fosfato Dibásico Anhidro 99,0 % (Biopack)
- Sodio Fosfato Monobásico Anhidro 99,0% (Biopack)
- Tirosinasa de hongo, polvo liofilizado ≥ 1000 unidades/mg sólido (Sigma-Aldrich)

2.4.2. Muestras

Se trabajó con muestras de la variedad Quinoa Real (Blanca, Roja y Negra), fueron otorgadas por la Empresa IRUPANA ANDEAN ORGANIC FOOD S.A. y la variedad Quinoa Jacha Grano por el Municipio de UMALA LA PAZ, en ambos casos los proveedores dieron el nombre de las variedades otorgadas.

Tabla 2.11. Resumen de las referencias de las muestras estudiadas

Referencia de la muestra	Tipo de muestra	Otorgada por:
QJG	Quinoa Jacha Grano	Municipio de UMALA LA PAZ
QRB	Quinoa Real Blanca	Empresa IRUPANA
QRR	Quinoa Real Roja	Empresa IRUPANA
QRN	Quinoa Real Negra	Empresa IRUPANA

2.4.2.1. Matriz

Harina de quinua: Se obtuvo a partir de los granos de Quinoa Jacha Grano y tres variedades de Quinoa Real (Blanca. Roja y Negra).

Para la obtención de harina, se realizó a partir de la molienda con un molidor-dosificador de granos (Marca: La Pavoni S.p.A., Modelo: Zip, Serie: Base-Automático), para su posterior

tamizado se realizó con un tamiz de 250 μm (No. 60) (Retschun, ASTM E11), y posteriormente se guardaron en bolsas herméticas de plástico.

Tabla 2.12. Resumen de referencias de las harinas de quinua

Referencia de la muestra	Tipo de muestra
HQJG	Harina de Quinua Jacha Grano
HQRB	Harina de Quinua Real Blanca
HQRR	Harina de Quinua Real Roja
HQRN	Harina de Quinua Real Negra

2.4.3. Análisis Fitoquímico preliminar

Se realizó un análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la Quinua Jacha Grano, según la metodología descrita por Villacrés (2013), sometido el extracto a pruebas cualitativas de color y/o precipitación como se muestra en la Figura 2.23., las mismas que detectan la presencia abundante (+++), moderada (++) y escasa (+) de diversos grupos de metabolitos como: azúcares reductores, lactonas y cumarinas, triterpenos y esteroides, fenólicos, saponinas, proteínas, glicósidos cardiotónicos, alcaloides, flavonoides y taninos.

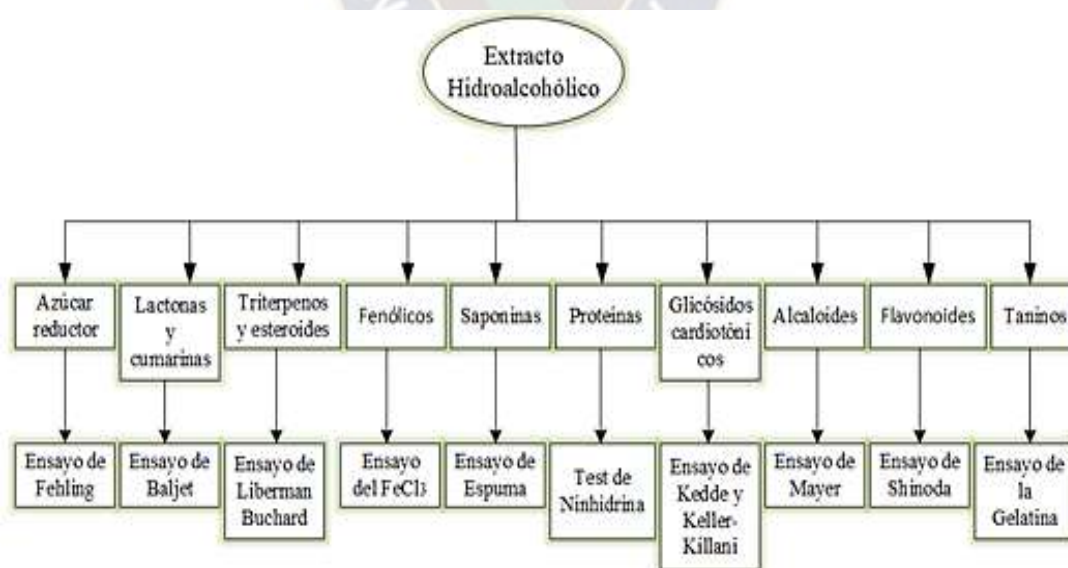


Figura 2.23. Esquema del análisis fitoquímico preliminar para determinar cualitativamente grupos de metabolitos

2.4.4. Obtención de extractos

2.4.4.1. Obtención de harina desengrasada de las variedades de Quinoa

Se utilizó la metodología de la Norma Boliviana NB 312027 con algunas modificaciones. La harina de quinoa, de las cuatro variedades, se pesó QJG (1591 g), QRB (76.5 g), QRR (100.0 g) y QRN (100.0 g) en papel filtro y se envolvió la muestra para evitar la pérdida de materia, se introdujo en el extractor Soxhlet y se adicionó al balón recolector éter de petróleo fracción 40-60. Se realizó la extracción por un tiempo de 6 horas, después se realizó la evaporación del solvente con un rotaevaporador.

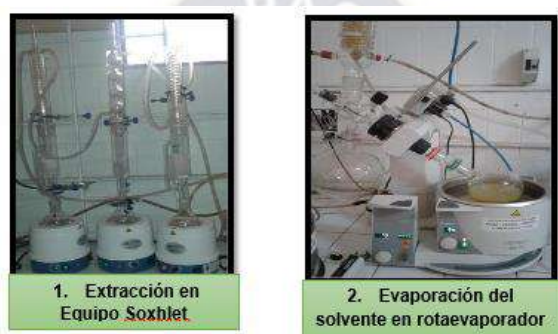


Figura 2.24. Proceso del desengrasado de las variedades de quinoa

2.4.4.2. Extracto Hidroalcohólico (EHA) de las variedades de Quinoa

A partir de la harina desengrasada de las cuatro variedades, QJG (1,5 Kg), QRB (70.0 g), QRR (90.5 g) y QRN (90,9 g), se obtuvo los extractos hidroalcohólicos (EHA), por maceración a temperatura ambiente durante 24 horas con etanol 96°/agua (80:20), en una relación 1:10 (peso: volumen). Se filtró los extractos a gravedad con papel filtro Whatman #4 y se concentró por rotaevaporación hasta la eliminación completa del etanol. Finalmente, el extracto concentrado se secó por liofilización, para la eliminación de los residuos de agua, obteniéndose así un extracto totalmente seco y el rendimiento del extracto respecto a la materia de partida (harina de quinoa desengrasado).

Tabla 2.13. Resumen de las referencias de los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinoa

Referencia del extracto	Tipo de extracto
EHA-QJG	Extracto Hidroalcohólico de Quinoa Jacha Grano
EHA-QRB	Extracto Hidroalcohólico de Quinoa Real Blanca
EHA-QRR	Extracto Hidroalcohólico de Quinoa Real Roja
EHA-QRN	Extracto Hidroalcohólico de Quinoa Real Negra

El rendimiento del extracto hidroalcohólico con respecto a la harina desengrasada, se determinó con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{M_{EH}}{M_{HQ}} * 100$$

Donde:

R = Rendimiento en %

M_{EH} = Masa del extracto hidroalcohólico seco en g (EHA-QJG, EHA-QRB, EHA-QRR, EHA-QRN)

M_{HQ} = Masa de harina de quinua desengrasada en g (QJG, QRB, QRR, QRN)

2.4.4.3. Fracciones Ricas en Compuestos Fenólicos de la variedad Quinua Jacha Grano

Se realizó las siguientes extracciones:

Primera extracción (AEA-1). A partir del extracto EHA-QJG, se procedió a realizar la primera extracción. Se pesó el extracto hidroalcohólico obtenido y se adicionó una mezcla de solventes, acetato de etilo/etanol 96°/agua (50:45:5), en una relación 1:10 (peso: volumen), llevando a una agitación constante durante cinco horas a 50°C. Se filtró el extracto a gravedad con papel filtro Whatman #4 y se concentró por rotaevaporación hasta sequedad. Finalmente, el extracto concentrado se secó por liofilización, para la eliminación de los residuos de agua, obteniéndose así el extracto totalmente seco y el rendimiento del extracto respecto a la materia de partida.

Segunda extracción (AEA-2). El residuo de la primera extracción (AEA-1), se sometió a dos extracciones sucesivas más, se realizó con la misma relación y proporción de la mezcla de solventes y con los mismos parámetros de agitación y temperatura, dando las fracciones **AEA-3 y AEA-4.**

Las fracciones (AEA-1, AEA-2, AEA-3 y AEA-4) fueron analizadas por placas TLC con H₂SO₄ (5%), para la determinación de los compuestos fenólicos.

Tabla 2.14. Resumen de las referencias las fracciones ricas en compuestos fenólicos

Fracción	Tipo de Fracción
AEA-1	Acetato de etilo/etanol 96°/agua (Primera fracción)
AEA-2	Acetato de etilo/etanol 96°/agua (Segunda fracción)
AEA-3	Acetato de etilo/etanol 96°/agua (Tercera fracción)
AEA-4	Acetato de etilo/etanol 96°/agua (Cuarta fracción)

El rendimiento del extracto rico en compuestos fenólicos con respecto a los extractos iniciales, se determinó con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{M_{FR}}{M_{Ei}} * 100$$

Donde:

R = Rendimiento en %

M_{FR} = Masa de la fracción rica en compuestos fenólicos en g

M_{Ei} = Masa del extracto inicial en g

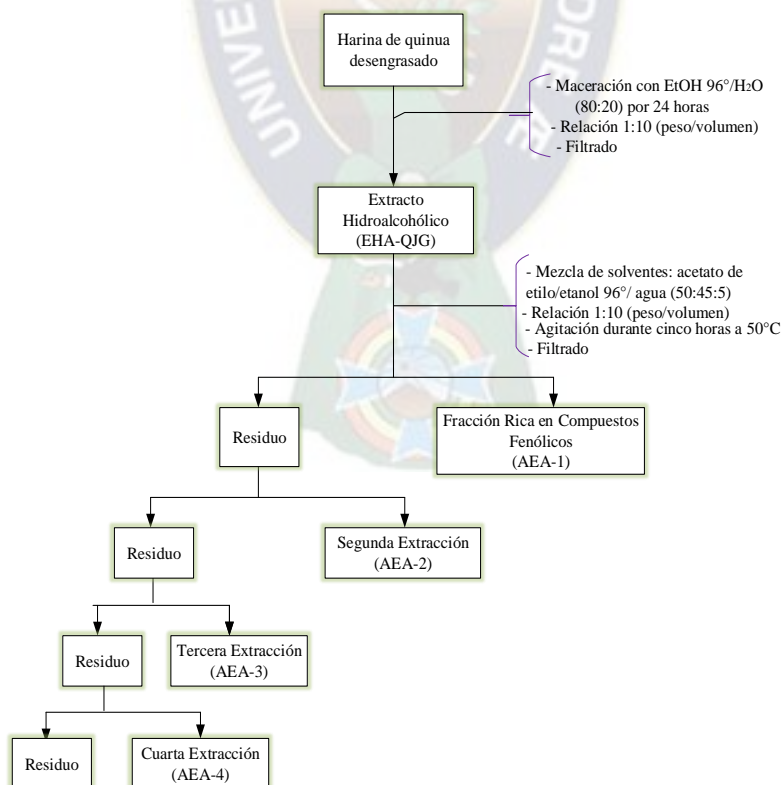


Figura 2.25. Proceso para la obtención de los extractos hidroalcohólicos y extractos ricos en compuestos fenólicos

2.4.5. Aislamiento del Flavonoide mayoritario

El aislamiento del flavonoide mayoritario de la QJG, se realizó a partir de la fracción AEA-1. Tomándose 14,0 g en total de AEA-1 y se realizó 7 columnas de cromatografía de exclusión molecular para la obtención de fracciones ricas en flavonoides.

2.4.5.1. Separación de flavonoides por Cromatografía de Exclusión Molecular

Inicialmente se pesó 2,0 g de AEA-1, se disolvió en una mezcla de etanol 96°/agua (95:5) y se pasó por un filtro PTFE 0,2 µm, para separar algunas impurezas, se sembró en una columna Sephadex LH-20, obteniéndose 60 fracciones en total, para su seguimiento se realizó placas TLC, de las cuales se unió las fracciones similares y se obtuvo dos fracciones: fracciones **FI** sin flavonoides y **FII** con flavonoides.

Este proceso se repitió 7 veces obteniéndose finalmente **598.0 mg** de una fracción rica en flavonoides (FII).

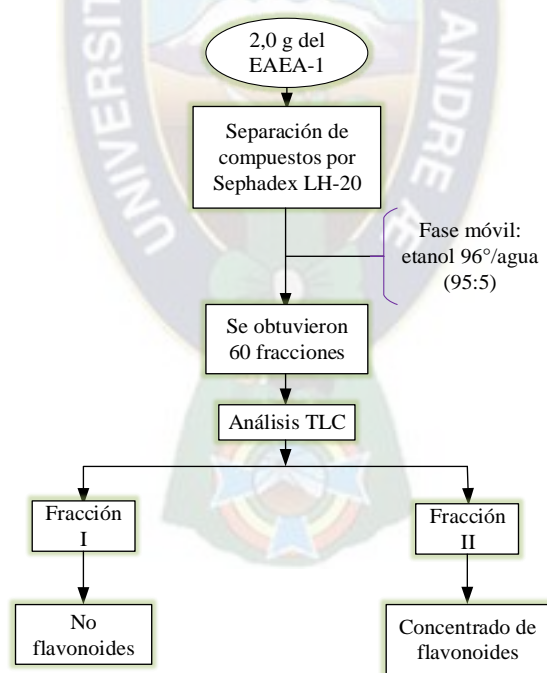


Figura 2.26. Proceso de la separación de flavonoides por Sephadex LH-20

2.4.5.2. Aislamiento del Flavonoide por HPLC preparativa

La fracción FII, fue sometida a una separación mediante cromatografía HPLC-prep Shimadzu (High Performance Liquid Chromatography-Preparative), que consta de una

columna Restek Ultra C-18 de 5 μm x 100 x 10 mm; un detector UV-Vis, modelo SPD-20 A; la bomba es isocrática LC-20AP acoplado a un colector de fracciones. Para la separación se utilizó una mezcla isocrática de acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% (17:83) y un flujo de 4 mL/min.

- Se preparó la fracción a una concentración de 15 000 ppm (30.0 mg/2 mL), en metanol grado HPLC, haciéndola pasar previamente por un filtro PTFE 0,2 μm ; se inyectó manualmente volúmenes consecutivos de 500 μl . El cromatograma se observó a una longitud de onda de 280 nm, y se procede a recolectar las fracciones correspondientes en un volumen aproximado de 3 ml. Este proceso se realizó para los 598.0 mg de la fracción rica en flavonoides (FII)
- Mediante el análisis del cromatograma se determinó que las fracciones de interés eran: **4** ($T_R=3.5-4.1$ min), **5** ($T_R=4.1-4.3$ min) y **6** ($T_R=4.3-4.5$ min), debido a presencia del flavonoide mayoritario de interés (Figura 2. 24). Luego se realizó el análisis de esas fracciones por placas TLC que mostraron el mismo R_f , sin embargo, no se unieron y se pasaron a análisis por RMN.

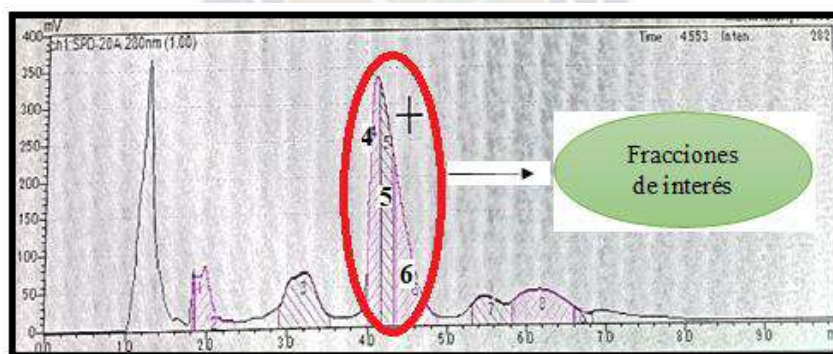


Figura 2.27. Cromatograma de las fracciones obtenidas por HPLC preparativa

2.4.6. Identificación del Flavonoide aislado por espectroscopia de RMN

Para identificar el flavonoide mayoritario, se pasaron las fracciones 4, 5 y 6 a un análisis por RMN ^1H , observándose que se trataba del mismo compuesto, por lo que se unieron las tres fracciones, dando un peso de **23.6 mg** y se realizaron espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , para esto se empleó el equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 300 MHz, obteniéndose los siguientes resultados:

Mauritianin (Kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido):

RMN¹H (300 MHz, DMSO) Kaempferol: δ 6.36 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-6), 6.14 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-8), 8.03(2H, *d*, *J* = 10.2 Hz, H-2', H-6'), 6.85 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-3', H-5'), Señales importantes de los azúcares: δ Gal - 5.55 (1H, *d*, *J* = 7.2 Hz, H anomérico), Ram- 5.08 (1H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H anomérico), 0.77 (3H, *d*, *J* = 6.6 Hz), Ram - 4.76 (1H, br s, H anomérico), 0.97 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO) δ : Kaempferol - 156.9 (C-2), 133.0 (C-3), 177.5 (C-4), 160.3 (C-5), 99.6 (C-6), 161.6 (C-7), 94.4 (C-8), 156.7 (C-9), 103.9 (C-10), 121.4 (C-1'), 131.2 (C-2'), 115.5 (C-3'), 156.9 (C-4'), 115.5 (C-5'), 131.2 (C-6'), Gal - 100.5 (C-1''), 75.3 (C-2''), 74.8 (C-3''), 70.9 (C-4''), 74.3 (C-5''), 68.9 (C-6''), Ram - 101.0 (C-1'''), 71.1 (C-2'''), 71.0 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 65.8 (C-5'''), 17.7 (C-6'''), Ram - 99.5 (C-1'''), 68.7 (C-2'''), 68.6 (C-3'''), 72.3 (C-4'''), 65.2 (C-5'''), 18.4 (C-6''').

2.4.7. Cuantificación del Mauritianin**2.4.7.1. Curva de calibración del compuesto mauritianin**

La cuantificación del compuesto se realizó en un equipo HPLC 1100 de Agilent Technologies que consta de una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío continuo, un inyector manual y un detector de arreglo de diodos (DAD). Las separaciones se llevaron a cabo a 40°C en una columna Agilent Eclipse Plus RP-C18 (250 mm de longitud x 4.6 mm diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μ m) con un filtro de precolumna de 0.5 μ m (Agilent Technologies). Como fase móvil se utilizó un sistema binario, acetonitrilo (grado HPLC), ácido fórmico al 0,1% en agua ultra pura, basado en el método descrito por Paško *et al.* (2008) con algunas modificaciones. El agua previamente antes de usar, se filtra a través de un sistema de filtración de 0.45 μ m (Sartorius Stedim Biotech).

El volumen de inyección de las muestras fue de 25 μ L, a un caudal de 1.0 mL/min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (C): Ácido fórmico 0.1% y (D): Acetonitrilo. El gradiente de elución aplicado fue: 95 % C y 5 % D de 0 a 21 min., 75 % C y 25 % D de 22 a 31 min., 45% C y 55 % D de 32 a 35 min.. Los eluidos se detectaron a 360 nm.

La señal del mauritianin fue determinado a 360 nm a un $T_R=19.8$ min.

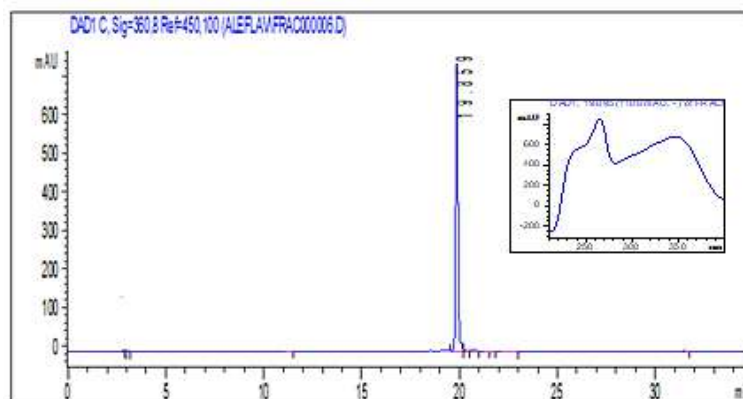


Figura 2.28. Cromatograma HPLC-DAD del mauritianin a 360 nm aun tiempo de retención de 19.8 min.

Se realizó inicialmente una curva de calibración, utilizando el mauritianin aislado de QJG. Se preparó una solución madre del analito a cuantificar (mauritianin) a 1 500 ppm en metanol grado HPLC, se filtró con un filtro PTFE 0,2 μm . de esta solución madre se tomó alícuotas para preparar soluciones de diferentes concentraciones de 25, 50, 75, 100, 125 y 150 ppm.

La curva de calibración se obtuvo midiendo el área de cada pico correspondiente a cada concentración, obteniéndose una correlación lineal de Área Vs Concentración. La curva elaborada (Figura 2.29.) sigue la ecuación $y = 8.6036x + 15.277$ ($R^2=0.998$), el coeficiente de correlación muestra una buena linealidad.

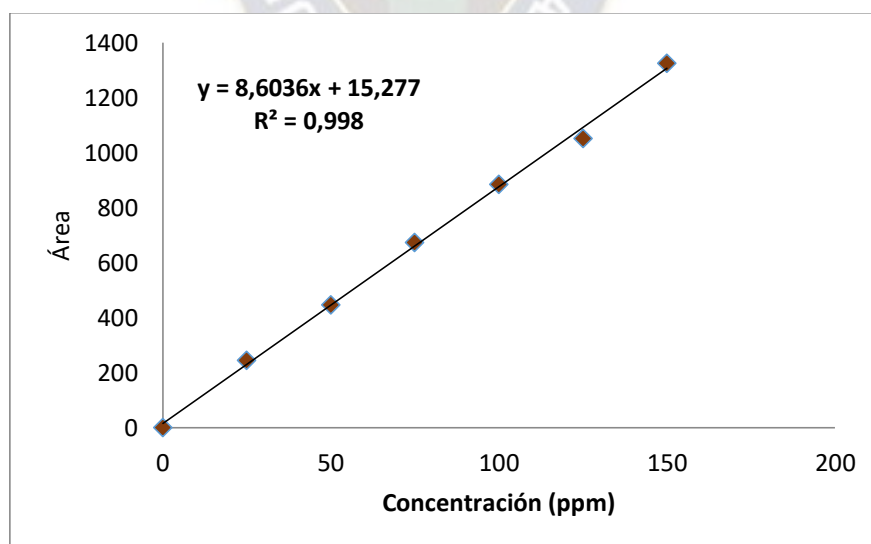


Figura 2.29. Curva de calibración del mauritianin

2.4.7.2. Cuantificación del compuesto mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinua y las fracciones ricas en compuestos fenólicos

La cantidad de mauritianin fue determinada utilizando la curva de calibración descrita en el anterior punto.

Se pesaron 30.0 mg de cada muestra en 5 mL de metanol, posteriormente se hizo pasar por un filtro de 0.2 μm y se inyectó 25 μl de la solución. Luego, el área del compuesto con un tiempo de retención $T_R=19.8$ min., se registró por triplicado, en donde el promedio se usó para el cálculo de la cantidad de mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades y las fracciones ricas en compuestos fenólicos.

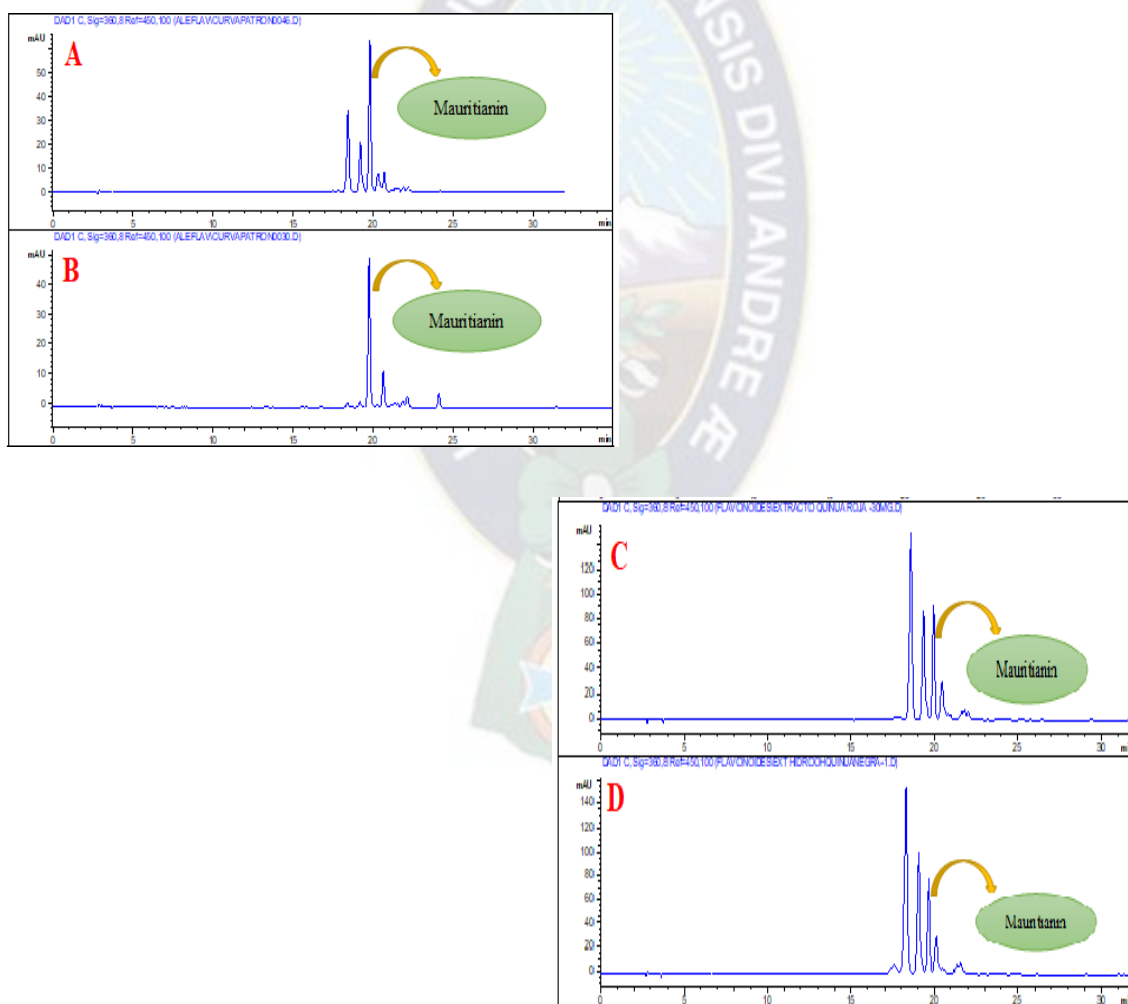


Figura 2.30. Cromatogramas HPLC-DAD de los 4 extractos hidroalcohólicos a 360 nm: **A.** EHA-QBR; **B.** EHA-QJG; **C.** EHA-QRR y **D.** EHA-QRN, en donde se observa el compuesto a cuantificar (Mauritianin)

2.4.8. Determinación de la Actividad Antitirosinasa in vitro de los extractos, fracciones y del mauritianin

El ensayo de inhibición de la Tirosinasa se llevó a cabo según la metodología descrita por Momtaz *et al.* (2008) y Lim *et al.* (2009). La determinación de la actividad antitirosinasa, se realizó mediante un ensayo colorimétrico, enzimático, que proporciona datos cuantitativos mediante análisis espectrofotométrico, utilizando L-Tirosina como sustrato. Se determinó el porcentaje de inhibición de la Tirosinasa de las muestras (EHA-QJG, AEA-1, AEA-2, EHA-QRB Mauritianin), utilizando 70 μ L de la muestra (5.0 mg/mL de tampón fosfato pH 6.5; 50 mM) con 30 μ L de la enzima L-Tirosinasa (0.20 mg/mL de tampón fosfato pH 6.5; 50 mM)), esta mezcla se agitó en un vortex y se incubó durante 60 min a 37°C, luego se adicionó 110 μ L del sustrato L-Tirosina (3.6 mg/10 mL de tampón fosfato pH 6.5; 2 mM), se agitó nuevamente y se incubó durante 15 min. mas a 37°C, la lectura de absorbancia se midió a 492 nm. Como control positivo se utilizó Ácido Kójico, (5.0 mg/1mL de tampón fosfato pH 6.5; 50 mM) y como blanco de reactivo se usó tampón fosfato (pH 6.5; 50 mM). Los análisis se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como valores promedio y su desviación estándar (DS)

El porcentaje de Inhibición de la Tirosinasa, se determinó con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

Donde:

I = Inhibición de la Tirosinasa en %

A_{control} = Absorbancia del blanco de reactivo

A_{muestra} = Absorbancia de las muestras

2.4.9. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos, fracciones y del mauritianin

El contenido fenólico total en las muestras (EHA-QJG, AEA-1, AEA-2, EHA-QRB Mauritianin), se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu en base a la metodología de Labiad *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. Se tomó 10 μ L de la muestra (30.0 mg/5mL

de metanol para los extractos y 4.0 mg/5mL de metanol para el Mauritianin) con una mezcla de 500 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu (1:10 v/v), 400 μ L de carbonato de sodio al 7.5 % (m/v) y 90 μ L de agua destilada. Esta mezcla se agitó en un vortex y se incubó durante 15 min a 45°C y la absorbancia se midió a 765 nm. Los análisis se realizaron por triplicado y el resultado se expresó como valores promedio y su desviación estándar (DS)

Para la determinación del contenido fenólico total, se construyó una curva de calibración con Ácido Gálico a diferentes concentraciones: 40, 80, 120, 160 y 200 mg/mL en las mismas condiciones mencionado anteriormente. La curva elaborada (Figura 2. 26.) sigue la ecuación $y = 0.0014x + 0.0027$ ($R^2=0.999$), el coeficiente de correlación muestra una buena linealidad.

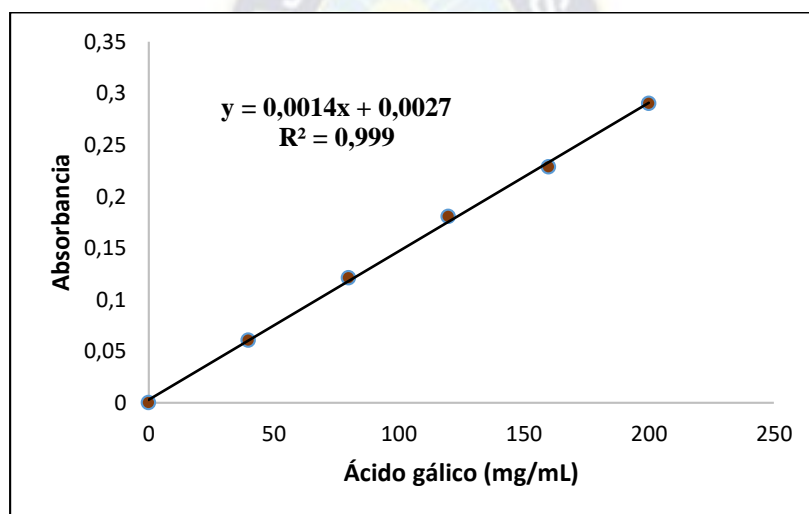


Figura 2.31. Curva de calibración del Ácido gálico

Se estimó el contenido fenólico total a partir de la curva de calibración de ácido gálico.

$$y = 0.0014x + 0.0027$$

Donde:

y = Absorbancia a 765 nm

x = mg EAG (Equivalentes de ácido gálico)/mL de muestra

A partir de la ecuación se determinó los mg EGA, con la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - 0.0027}{0.0014}$$

2.4.10. Determinación de la Actividad Antioxidante por el método ABTS de los extractos, fracciones y del mauritianin

La actividad de barrido contra el radical catión $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se midió de acuerdo al método propuesto por Tejeda *et al.* (2008) con ligeras modificaciones. El radical catión $ABTS^{\bullet+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato (2.42 mM), se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h.. El día del análisis, la solución $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con etanol a una absorbancia de 0.70 (\pm 0.02) a 734 nm. Se preparó extractos y fracciones disolviendo 30.0 mg de cada uno en 5mL de metanol, y el mauritianin se preparó disolviendo 4.0 mg en 5 mL de metanol. Para la medición de la actividad, se agitaron 100 μ L de la muestra con 1000 μ L de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ en un vortex y se registró la absorbancia a 734 nm.

Para la determinación de la actividad antioxidante en base al Trolox, se construyó una curva estándar del antioxidante de referencia, Trolox, a diferentes concentraciones: 100, 250, 500, 750 y 1000 μ M en las mismas condiciones mencionado anteriormente. La curva elaborada (Figura 2. 26.) sigue la ecuación $y = -0.0005x + 0.6512$ ($R^2=0.998$), el coeficiente de correlación muestra una buena linealidad.

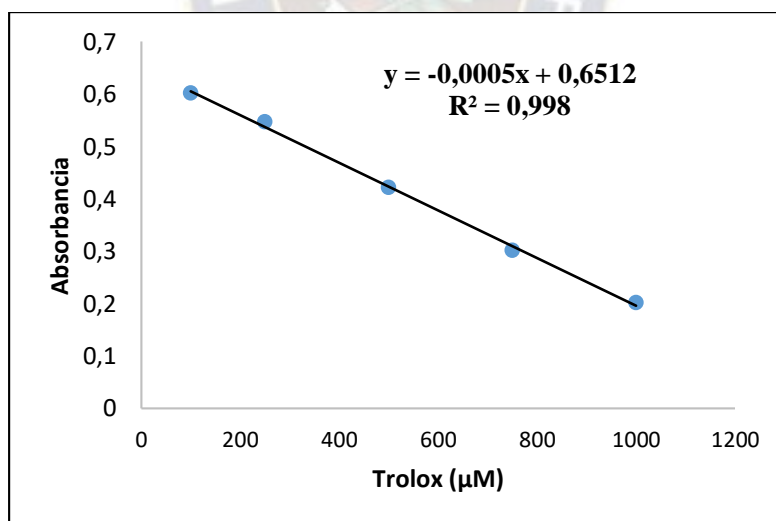


Figura 2.32. Curva de calibración del Trolox

Se estimó la cantidad Trolox a partir de la curva estándar de Trolox.

$$y = -0.0005x + 0.6512$$

Donde:

y = Absorbancia a 765 nm

x = μmol (μM) ET (Equivalente de Trolox)

A partir de la ecuación se determinó los μmol ET, con la siguiente fórmula:

$$x = \frac{0.6512 - y}{0.0005}$$

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Análisis fitoquímico preliminar

El extracto hidroalcohólico (24 horas) de la variedad Jacha Grano, fue sometido al análisis fitoquímico preliminar, que son pruebas cualitativas de color y/o precipitación, las mismas que detectan la presencia de grupos de metabolitos.

Tabla 2.15. Estudio fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de la Quinoa Jacha Grano

Ensayo	Metabolito	Extracto hidroalcohólico
Fehling	Azúcar reductor	(++)
Lieberman Buchard	Triterpenos y esteroides	(++)
Fenólicos	Cloruro férrico	(++)
Espuma	Saponinas	(++)
Ninhidrina	Proteínas	(-)
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	(+)
Keller-Killani	Glicósidos cardiotónicos	(+)
Mayer	Alcaloides	(-)
Shinoda	Flavonoides	(+)
Acetato de plomo	Taninos	(+++)

(+++) presencia abundante, (++) presencia moderada, (+) presencia escasa, (-), sin presencia (-)

Como se observa en la Tabla 2.15., los resultados del análisis fitoquímico preliminar, muestra que el extracto tiene en gran cantidad taninos, una presencia moderada de compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides, saponinas y azúcares reductores una presencia escasa de flavonoides y glicósidos cardiotónicos, y finalmente no cuenta con la presencia de proteínas y alcaloides.

2.5.2. Obtención de extractos

2.5.2.1. Extracto Hidroalcohólico (EHA) de las variedades de Quinua

El proceso de extracción comenzó con la separación de las grasas con éter de petróleo del material seco pulverizado (harina) como se describe en la sección de metodología en el apartado 2.4.4.1., seguido de una maceración con EtOH 96°/H₂O (80:20) durante 24 h a temperatura ambiente, descrita en la metodología en el apartado 2.4.4.2..Se determinó el rendimiento de extracción, inicialmente se registró el peso seco del extracto., determinándose así los siguientes valores que se muestran en la Tabla 2.16.

Tabla 2.16. Rendimiento de las extracciones hidroalcohólicas para las dos variedades de quinua

Variedad de Quinua	Peso extracto hidroalcohólico seco (g)	Rendimiento %
QJG	86.3	5.8
QRB	3.7	3.7
QRR	4.5	5.0
QRN	4.2	4.6

Con respecto a los resultados obtenidos, se observa que el EHA-QJG, presenta mayor rendimiento (5.8 % con respecto a 3.7 - 5.0 % para las otras quinuas), además fue la variedad con mayor cantidad de materia prima, 1591 g respecto a las otras variedades de Quinua Real, alrededor de 100 g. Entonces, la QJG fue elegido para obtener las fracciones ricas en compuestos fenólicos y para el aislamiento del flavonoide mayoritario.

La maceración hidroalcohólica puede conducir a la extracción de algunos metabolitos primarios, como azúcares y proteínas, oligoelementos y metabolitos secundarios polares, como saponinas y flavonoides glicosilados.

2.5.2.2. Fracciones Ricas en Compuestos Fenólicos de la variedad Quinua Jacha Grano

Los flavonoides glicosilados son menos polares, por lo que para obtener una fracción rica en flavonoides glicosilados se realizaron extracciones sucesivas con una mezcla de EtOAc/EtOH 96°/ H₂O (50:45:5) como se describe en el apartado 2.4.4.3..Se obtuvo cuatro fracciones (Tabla 2.17.), determinándose los pesos y rendimiento de extracción.

Tabla 2.17. Rendimiento de las extracciones a partir del extracto hidroalcohólico (24 horas) de la variedad QJG

Extracción	Peso inicial antes de la extracción (g)	Peso final después de la extracción (g)	Rendimiento %
AEA-1	86.3	19.9	23.1
AEA-2	66.0	12.4	18.8
AEA-3	53.2	9.2	17.3
AEA-4	42.2	2.2	5.2



H₂SO₄ al 5%

Figura 2.33. Placa TLC de las cuatro extracciones: 1) AEA-1; 2) AEA-2; 3) AEA-3; 4) AEA-4

En la Figura 2.33., claramente se observa, la presencia de compuestos fenólicos en estas fracciones, donde se observó que los compuestos fenólicos están presentes principalmente en la primera fracción (AEA-1), en la segunda fracción (AEA-2) hay un poco y en la tercera (AEA-3) y cuarta fracción (AEA-4) no hay nada. Por lo tanto, se decidió aislar el flavonoide mayoritario de la primera fracción.

2.5.3. Aislamiento del Flavonoide mayoritario

2.5.3.1. Separación del flavonoide por cromatografía de exclusión molecular

El procedimiento se describe en el apartado 2.4.5.1. La fracción AEA-1 se sometió a una cromatografía de exclusión molecular (Sephadx LH-20), donde las primeras fracciones que no son flavonoides se separaron de las últimas fracciones con flavonoides, obteniéndose 60 fracciones, las cuales fueron analizadas por TLC, y se unió las fracciones similares y se obtuvo 2 fracciones en total de las agrupaciones, como se muestra a continuación en la Figura 2.31.



H_2SO_4 al 5%

Figura 2.34. Placas TLC de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular: **1)** Fracción I (No flavonoides); **2)** Fracción II (Concentrado de flavonoides)

Tabla 2.18. Pesos de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular

Tipo de Fracción	Fracción (mg)
FI	180.2
FII	598.0

2.5.3.2. Aislamiento del Flavonoide por HPLC preparativa

Como se describe el procedimiento en el apartado 2.4.5.2., la fracción FII se sometió a una cromatografía HPLC preparativa, donde se obtuvieron tres fracciones (4, 5 y 6) de interés, por corresponder al pico del compuesto mayoritario. Las tres fracciones fueron analizadas en placas TLC (Figura 2.28), corroborándose que las tres fracciones tienen el flavonoide de interés.

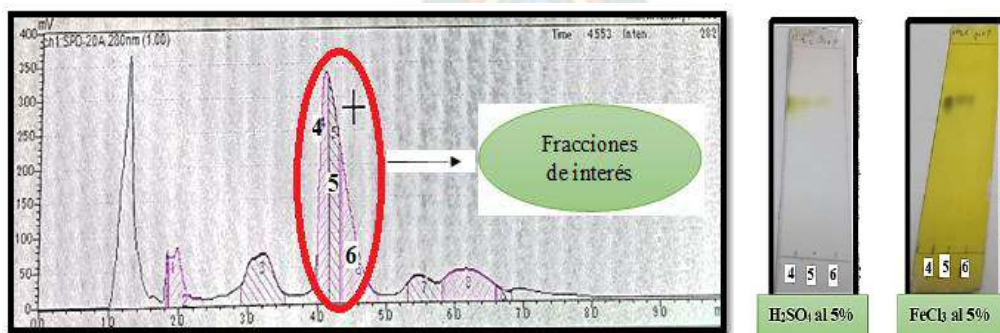
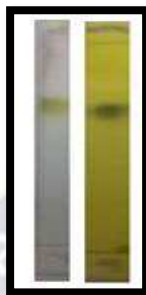


Figura 2.35. Cromatograma obtenido en el HPLC preparativo de la Fracción rica en flavonoides y placas TLC de las fracciones de interés

Adicionalmente, se realizó los espectros de RMN de las tres fracciones, que confirmó que se trataba del mismo compuesto. Por lo tanto, se procedió a unir las tres fracciones, obteniéndose 23.6 mg del flavonoide mayoritario aislado (Figura 2.33) con un rendimiento del 4 %.



H_2SO_4 al 5%, FeCl_3 al 5%

Figura 2.36. Flavonoide aislado y sus placas TLC

2.5.4. Identificación del Flavonoide aislado

El flavonoide mayoritario, se identificó como Mauritianin (**Kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido)**) usando un análisis espectroscópico de RMN y comparación con datos bibliográficos.

El **mauritianin** es un flavonoide glicosilado con un Kaempferol como genina y tres monosacáridos, unidos al C-3 a través del enlace *O*-glicosídico. Este compuesto ha sido reportado previamente en otras variedades de quinua, como uno de los principales flavonoides (De Simone, 1990). Así, el espectro de RMN¹H mostro claramente la genina (Kaempferol) (Anexo..) observándose dos protones aromáticos acoplados en *meta* a δ 6.36 *d* y 6.14 *d* ($J = 1.8$ Hz), correspondientes a los protones H-6 y H-8, y un sistema aromático *para*-di sustituido con dos dobletes acoplados en *orto* cada uno para dos protones a δ 8.03 (2H, *d*, $J = 10.2$ Hz, H-2', H-6') y δ 6.85 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), correspondiente al anillo B. Además, se distinguen 3 protones anoméricos de tres monosacáridos unidos a la posición C-3 del Kaempferol a δ 5.55 *d*, 5.08 *d* y 4.76 *d*, y dos metilos a δ 0.77 (*d*, $J = 6.6$ Hz) y 0.97 (*d*, $J = 6.0$ Hz), que hacen pensar que dos de los monosacáridos son ramnosas, que son metilpentosas, que normalmente se encuentran como ramnopiranosas, todo lo cual está de acuerdo con la estructura del Mauritianin (Figura 2.34)

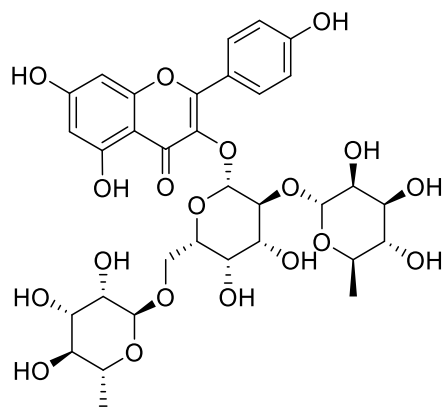


Figura 2.37. Estructura del Mauritianin

El espectro de RMN ^{13}C , con respecto a la aglicona (Kaempferol), presenta las siguientes señales: se observa 15 señales de carbono, característica del esqueleto tipo flavonoide, entre 94.4 y 177.5 ppm, se observa la característica señal del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) a δ 177.5, que corresponde al C4, adicionalmente se encuentran las señales de los carbonos sustituidos por oxígeno, como el C4' del anillo B aun desplazamiento de 156.9 ppm, así mismo, los carbonos C5 y C7 del anillo A a δ 160.3 y 161.6, respectivamente y el C3 a δ 133.0, cuyo desplazamiento se ve afectado por el grupo carbonilo vecino. La parte glicosídica (-3-O-(2,6-di-O- α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido), se encuentra como O-glicósido unido al C3, como se puede determinar por el acoplamiento a larga distancia entre el protón anomérico H-1" con el C3. Finalmente, todas las señales fueron comparadas con datos bibliográficos (Tabla 2.19), confirmando que el flavonoide aislado es el Mauritianin.

Tabla 2.19. Desplazamientos de ^{13}C -RMN del Mauritianin

N° de C	$\delta^{13}\text{C}$ *	$\delta^{13}\text{C}$ **
	ppm	ppm
Aglicona		
2	156.9	158.7
3	133.0	134.5
4	177.5	179.5
5	160.3	163.2
6	99.6	99.8
7	161.6	165.7
8	94.4	94.7
9	156.7	158.5
10	103.9	105.9
1'	121.4	123.1
2'	131.2	132.3
3'	115.5	116.2
4'	156.9	161.3
5'	115.5	116.2
6'	131.2	132.3
3-Galactosil		
1''	100.5	100.9
2''	75.3	77.6
3''	74.8	75.8
4''	70.9	70.7
5''	74.3	75.3
6''	68.9	67.1
2-Ramnosil		
1'''	101.0	102.7
2'''	71.1	72.5
3'''	71.0	72.3
4'''	73.7	74.1
5'''	65.8	69.9
6'''	17.7	17.6
6-Ramnosil		
1''''	99.5	101.9
2''''	68.7	72.1
3''''	68.6	72.4
4''''	72.3	73.9
5''''	65.2	69.7
6''''	18.4	18.0

*) Experimental en DMSO 75MHz, **) Referencia en CD₃OD 100MHz (Hirose, 2010)

A continuación, se muestra las características del mauritianin:



Características	Mauritianin
Nombre Químico	Mauritianin
Nombre Comercial	Kaempferol-3- <i>O</i> -(2,6-di- <i>O</i> - α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido)
Aspecto	Polvo sólido, amarillo
Formula Molecular	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉
Peso Molecular	740.7 g/mol
Solubilidad	Soluble en Metanol, etanol, DMSO

2.5.5. Cuantificación del compuesto mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinua y las fracciones ricas en compuestos fenólicos

Se cuantificó el mauritianin en las cuatro variedades de quinua, así como en extractos, fracciones ricas en compuestos fenólicos (Tabla 2.20), mediante el método descrito en el apartado 2.4.7.1. de la parte experimental, que permite identificar el flavonoide glicosilado a un t_R de 19.8 min.

Tabla 2.20. Contenido del mauritianin en granos de quinua, extractos y fracciones ricas en compuestos fenólicos

Variedad de Quinua*	Extracto (Ex) o Fracción (Fr)*	Contenido de mauritianin en Ex o Fr (mg/g peso seco)*	Contenido de mauritianin en grano de quinua (mg/100 g peso seco)*
QJG	EHA	2.48 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02
	AEA-1	5.12 \pm 0.04	
	AEA-2	3.63 \pm 0.01	
QRB	EHA	3.34 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07
QRR	EHA	4.46 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
QRN	EHA	4.04 \pm 0.04	0.17 \pm 0.04

*Promedio de tres repeticiones (n=3) \pm desviación estándar

Como se muestra los resultados en la Tabla 2.20., se puede observar que en las variedades de Quinoa Real del Altiplano Sur (QRB, QRN y QRR) hay una mayor concentración de este flavonoide que en la variedad del Altiplano Central QJG. La concentración más alta se observa en la QRR, lo cual es consistente con la consideración de que los flavonoides participan en la coloración de las plantas. Además, se observa que la fracción rica en compuestos fenólicos, AEA-1, tiene la concentración más alta de mauritianin.

Por lo tanto, se tiene el siguiente orden decreciente, con respecto a la cuantificación del mauritianin en los extractos hidroalcohólicos de las cuatro variedades de quinoa y las fracciones ricas en compuestos fenólicos: AEA-1>EHA-QRR >EHA-QRN>AEA-2> EHA-QRB>EHA-QJG.

2.5.6. Evaluación de la Actividad Antitirosinasa *in vitro* de los extractos, fracciones y del mauritianin

Se obtuvieron los siguientes resultados con respecto al porcentaje de Inhibición de la Tirosinasa de los extractos, fracciones y del mauritianin.

Tabla 2.21. Porcentaje de Inhibición de la Tirosinasa, de los extractos, fracciones y del mauritianin

Muestra	Inhibición de la Tirosinasa %
Ácido Kójico (control)	92.44 ± 0.03
EHA-QJG	48.69 ± 0.04
EAEA-1	69.89 ± 0.02
EAEA-2	62.84 ± 0.01
EHA-QRB	58.70 ± 0.04
Mauritianin	74.73 ± 0.02

*Promedio de tres repeticiones (n=3) ± desviación estándar

La Tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de los pigmentos de melanina, responsables de la coloración de la piel, el cabello y los ojos, así como el dorado de los alimentos. Los inhibidores de la Tirosinasa tienen un buen potencial tanto dermatológicamente como en el procesamiento de alimentos, por lo que pueden ser clínicamente útiles para el tratamiento de algunos trastornos dermatológicos asociados con la hiperpigmentación, debido a la alta producción de melanina; así como en cosmética para despigmentación después de quemaduras (Almeda, 2015). El Ácido Kójico se utilizó como

control positivo, ya que muestra una alta inhibición de esta enzima (Almeda *et al.*, 2015; Bochot *et al.*, 2014). La Tabla 2.21. muestra que el porcentaje de inhibición de la Tirosinasa del mauritianin es comparable al ácido kójico, aunque algo menor, y la fracción AEA-1 también es interesante.

Según estudios realizados por Kim-Uyana (2005) y Lee *et al.* (2016), algunos flavonoides, como el kaempferol, la quercetina y la morina, mostraron una actividad inhibidora de la tirosinasa. Los estudios mostraron que los flavonoides que contienen un grupo α -ceto muestran una potente actividad inhibidora de la Tirosinasa (Kim y Uyana, 2005). Esta capacidad de inhibición puede explicarse en términos de similitud entre el grupo dihidroxifenilo en L-DOPA y el grupo α -ceto en flavonoides. Pero, la actividad de algunos flavonoles que poseen un resto 3-hidroxi-4-ceto, como el kaempferol y la quercetina, parece estar relacionada con su capacidad para quelar el cobre en el sitio activo, lo que lleva a una inactivación irreversible de la Tirosinasa. Los derivados de 3-*O*-glicósidos no mostraron actividad. Sin embargo, aunque el grupo hidroxilo en C-3 de alguna manera se relaciona con la actividad, puede no ser esencial porque varias flavonas, como luteolina y luteolina 7-*O*-glucósido, que carecen de este grupo 3-hidroxilo (Badria y El Gayyar, 2001), o 3-*O*-glicósidos como la quercetina-3-*O*-(6-*O*-malonil)- β -D-glucopiranosido y kaempferol-3-*O*-(6-*O*-malonil)- β -D-glucopiranosido (Yang *et al.*, 2012), todavía mostraron actividad de inhibición de la Tirosinasa, pero con otros mecanismos de inhibición, principalmente asociados con grupos hidroxilo fenólicos que podrían formar un enlace de puente de hidrógeno con aminoácidos del sitio activo de la Tirosinasa (Yang *et al.*, 2012; Salleh *et al.*, 2014). El mauritianin y la fracción rica en compuestos fenólicos AEA-1, mostraron un interesante potencial como inhibidores de la Tirosinasa, pero se necesita más estudios para demostrar su utilidad en este campo.

Por lo tanto, se tiene el siguiente orden decreciente, con respecto a la Inhibición de la Tirosinasa: Ácido Kójico > Mauritianin > EAEA-1 > EAEA-2 > EHA-QRB > EHA-QJG.

2.5.7. Evaluación del Contenido Fenólico Total (Folin-Ciocalteu) y la Actividad Antioxidante (ABTS) *in vitro* de los extractos, fracciones y del mauritianin

Se obtuvieron los siguientes resultados con respecto a la actividad antioxidante de los extractos y del Mauritianin.

Tabla 2.22. Cuantificación del contenido fenólico total y la actividad antioxidante en extractos, fracciones y mauritianin

Muestra	Folin-Ciocalteu (mg EAG/g peso seco)*	ABTS (μ M ET/g peso seco)*
EHA-QJG	131.150 \pm 0.001	446.04 \pm 0.02
EAEA-1	246.084 \pm 0.007	569.21 \pm 0.01
EAEA-2	240.265 \pm 0.010	563.49 \pm 0.01
EHA-QRB	140.439 \pm 0.004	455.91 \pm 0.04
Mauritianin	826.687 \pm 0.008	1141.38 \pm 0.03

*Promedio de tres repeticiones (n=3) \pm desviación estándar

Los derivados radicales del oxígeno (ROS) son los radicales libres más importantes en los sistemas biológicos y los subproductos nocivos generados durante las funciones celulares normales. El aumento de la ingesta de antioxidantes naturales puede ayudar a mantener un estado antioxidante tolerable. Los compuestos fenólicos y en particular los flavonoides son uno de los grupos más importantes con inhibición de los radicales libres. (Sarian *et al.* 2017). En este sentido, se evaluó los contenidos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu, y la inhibición de los radicales libres por el método ABTS. La Tabla 2.22. muestra que la mayor cantidad de equivalentes de ácido gálico (EAG) se encuentra en el mauritianin, esto se esperaba, porque es un compuesto puro, tiene tres grupos hidroxilo fenólicos en su estructura. Las fracciones AEA-1 y AEA-2 muestran una mayor concentración de fenoles que los extractos EHA, esto demuestra que el proceso para obtener fracciones ricas en compuestos fenólicos fue exitoso. Finalmente, observamos que la concentración de fenoles en QRB es mayor que en la QJG, lo que también puede contribuir al amargor de la quinua real. Con respecto al método ABTS, el mauritianin también es el que presenta la mayor actividad inhibitoria de los radicales libres, lo cual está de acuerdo con estudios previos, donde ya se demostró que este compuesto tiene propiedades antioxidantes debido a su capacidad para inhibir los radicales libres. Numerosos estudios han demostrado que el kaempferol y algunos de sus glicósidos tienen actividad antioxidante, no solo *in vitro*, sino también *in vivo*, esos estudios

han demostrado que la presencia de un doble enlace en C2-C3 junto con un grupo oxo en C4, y la presencia de grupos hidroxilo en C3, C5 y C4', son características estructurales importantes involucradas en la actividad antioxidante del kaempferol (Sarian *et al.* 2017; Cid-Ortega, Monroy-Rivera, 2018). El mauritianin tiene todas esas características estructurales, excepto el grupo OH en C-3, por lo que probablemente su actividad antioxidante es algo menor que la del kaempferol, pero eso se tiene que confirmar. Además, también es interesante observar que la fracción AEA-1 muestra interesantes propiedades antioxidantes, que aumentan las propiedades funcionales de estas variedades de quinua. Pero también, se necesita más estudios para probar la efectividad de la fracción AEA-1 y el mauritianin como antioxidantes, utilizando otros métodos antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, se tiene el siguiente orden decreciente, con respecto al contenido fenólico total y la actividad antioxidante: Mauritianin > EAEA-1 > EAEA-2 > EHA-QRB > EHA-QJG.

2.6. CONCLUSIONES

- Se estudió tres variedades de Quinoa Real (QRB, QRN, QRR) del Altiplano Sur y una variedad de grano grande (QJG) del Altiplano Central.
- Con el estudio fitoquímico preliminar del EHA-QJG, se verifica la presencia de compuestos fenólicos y los flavonoides, que son compuestos de estudio de interés, también se verifica la presencia de otros metabolitos, como, saponinas, glicósidos cardiotónicos, triterpenos y esteroides.
- Con respecto a los resultados de las extracciones hidroalcohólicas, se obtuvo un mayor rendimiento en la QJG (5.8%), que en las variedades de quinua real (3.7 % QBR, 5.0 % de la QRR y 4.6 % de la QRN)
- Para la obtención de fracciones ricas en compuestos fenólicos, se realizó extracciones sucesivas con acetato/etanol 96°/agua del EHA-QJG, obteniendo dos fracciones con los componentes de interés, AEA-1 (rendimiento de 23.1 %) y EAEA-2 (rendimiento 18.8 %)
- De la fracción EAEA-1, se aisló el flavonoide mayoritario de la quinua, mediante HPLC-prep, identificándolo por Espectroscopia de RMN, y comparación bibliográfica de los desplazamientos con respecto a datos bibliográficos (**Kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -ramnopiranosil- β -galactopiranosido)**)

- Se cuantifico el Mauritianin por un método HPLC analítico, en los extractos hidroalcohólicos y las fracciones enriquecidas en fenólicos, AEA-1 y AEA-2, de las tres variedades de quinua (Blanca, Roja y Negra) del Altiplano Sur y en la variedad QJG del Altiplano Central, determinándose una presencia mayoritaria en AEA-1 (5.12 mg/g AEA-1) y mayor presencia en las variedades de quinua real (3.34 – 4.6 mg/g EHA) que en la QJG (2.48 mg/g EHA), observándose una mayor concentración en las variedades de quinua real que en la QJG, en particular en la QRR y en la QRN, lo cual es consistente con la función de coloración de los flavonoides y el amargo de estas variedades.
- Se evaluó la actividad antioxidante (contenido fenólico total y ABTS) y antitirosinasa (tirosinasa de hongos) de los EHA, fracciones ricas en fenoles y del mauritianin , el mauritianin mostro una importante actividad antitirosinasa (74,73 %I a 1,67 mg/ml) y antioxidante (826.68 mg GAE/g y 1141.38 µM trolox/g), así como la fracción AEA-1 que muestra un 69.89 %I de la enzima tirosinasa y significativa actividad antioxidante (246.08 mg GAE/g y 569.21 uM trolox/g), lo cual sugiere que estos productos tienen una potencial aplicación en dermatológica, cosmética y en el procesamiento de alimentos.

2.7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la actividad antioxidante por otros métodos, como FRAP y DPPH, para realizar la correlación de los métodos.
- Se recomienda trabajar con las demás variedades de quinua, por el contenido de compuestos fenólicos, estos podrían tener diferentes actividades biológicas.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R., & Martín-Cabrejas, M. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44(3), 774-780.

Ahamed, N. T., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., & Pal, M. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19(1), 61-70.

Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E., & Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119(2), 770-778.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 997-1027.

Arora, P., & Chauhan, C. (2013). ACE Inhibitors: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(2), 532-548.

Arung, E. T., Furuta, S., Ishikawa, H., Kusuma, I. W., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). Anti-melanogenesis properties of quercetin-and its derivative-rich extract from *Allium cepa*. *Food chemistry*, 124(3), 1024-1028.

Asao, M. y. (2010). Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. *Food Science and Technology Research*, 16(2), 163-168.

Badarinath, A. V., Rao, K. M., Ramkanth, S. T., Rajan, T. V., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.

Bancuta, O. R., Chilian, A. B., ION, R., Setnescu, R., Setnescu, T., & Gheboianu, A. (2016). Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Rom. Journ. Phys*, 61(7-8), 1255-1264.

Bastidas, E. G., Roura, R., Rizzolo, D. A., Massanés, T., & Gomis, R. (2016). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from nutritional value to potential health benefits: an integrative review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6(3).

Boardbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761-1805.

Bochot, C., Gouron, A., Bubacco, L., Milet, A., Philouze, C., Réglie, M., & Belle, C. (2014). Probing kojic acid binding to tyrosinase enzyme: insights from a model complex and QM/MM calculations. *Chemical communications*, 50(3), 308-310.

Cardenas-Sandoval, B. A., López-Laredo, A. R., Martínez-Bonfil, B. P., Bermudez-Torres, K., & Trejo-Tapia, G. (2012). Avances en la fitoquímica de *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* y *C. lanceolata*: Extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 401-413.

Castro, M., López-Alonso, M., Rosina, Sánchez, R., & Ramos, M. (2006). *España Patente n° 2 253 036*.

CELANT, V., Braga, G. C., Vorpapel, J. A., & Salibe, A. B. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts of blackberries. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2).

CELANT, V., Braga, G. C., Vorpapel, J. A., & Salibe, A. B. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts of blackberries. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2).

Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2440-2475.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 131-141.

Chaurasia, P. K., Yadav, R. S., & Yadava, S. (2013). A review on mechanism of laccase action. *Res. Rev. Biosci*, 7(2), 66-71.

Choi, M. H., & Shin, H. J. (2016). Anti-melanogenesis effect of quercetin. *Cosmetics*, 3(2), 18.

Cid-Ortega, S., & Monroy-Rivera, J. A. (2018). Extraction of Kaempferol and Its Glycosides Using Supercritical Fluids from Plant Sources: A Review. *Food technology and biotechnology*, 56(4), 480.

Corradi, I., De Souza, E., Sande, D., & Takahashi, J. A. (2018). Correlation between phenolic compounds contents, anti-tyrosinase and antioxidant activities of plant extracts. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 109-114.

Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.

De Simone, F., Dini, A., Pizza, C., Saturnino, P., & Schettino, O. (1990). Two flavonol glycosides from *Chenopodium quinoa*. *Phytochemistry*, 29(11), 3690-3692.

Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2004). Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. *Food chemistry*, 84(2), 163-168.

Dong, J. W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J., & Ding, Z. T. (2015). Re-evaluation of ABTS•+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. *Natural product communications*, 10(12).

Dykes, L., & Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal foods world*, 52(3), 105-111.

- Eggum, B. (1997). Nutritional Aspects of Cereal Proteins. En A. R. In: Muhammed A., *Genetic Diversity in Plants* (págs. 349-369). Boston: Springer.
- Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1379-1391.
- Erdogan Orhan, I., & Tareq Hassan Khan, M. (2014). Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors—A survey of recent findings between 2008-2013. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(12), 1486-1493.
- Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., & Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Food Process Technol*, 3(3), 146-56.
- Gasowska-Bajger, B., & Wojtasek, H. (2016). Reactions of flavonoids with o-quinones interfere with the spectrophotometric assay of tyrosinase activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(26), 5417-5427.
- Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Caboni, M. F. (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionization–time-of-flight mass spectrometry methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 10815-10825.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J., Aranda-Barradas, J., & Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. *Biotechnology Advances*, 29, 983–996.
- Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 431-445.
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.
- Halabalaki, M., Urbain, A., Paschali, A., Mitakou, S., Tillequin, F., & Skaltsounis, A. L. (2011). Quercetin and kaempferol 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside]-7-O- α -L-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae*: Structure determination and conformational studies. *Journal of natural products*, 74(9), 1939-1945.
- Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 2(3), 27-47.

- Houngue, M. T., Doco, R. C., Kpotin, G. A., Kuevi, U. A., Simplicite, K., Wilfried, K., & Mensah, J. B. (2017). DFT study of chemical reactivity of free radicals ABTS^{o+} and DPPH^o by Myricetin, Quercetin and Kaempferol. *World Scientific News*, 90, 177-188.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., & Guerreiro, S. G. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 2277.
- Jung, H. A., Woo, J. J., Jung, M. J., Hwang, G. S., & Choi, J. S. (2009). Kaempferol glycosides with antioxidant activity from *Brassica juncea*. *Archives of pharmacal research*, 32(10), 1379.
- Kakumu, Y., Yamauchi, K., & Mitsunaga, T. (2019). Identification of chemical constituents from the bark of *Larix kaempferi* and their tyrosinase inhibitory effect. *Holzforchung*, 73(7), 637-643.
- Kim, J. S., Kwon, Y. S., Sa, Y. J., & Kim, M. J. (2010). Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1), 138-144.
- Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 62(15), 1707-1723.
- Konan, K. V., Le Tien, C., & Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 8(28), 5638-5644.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for Designing Future. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Koval, I. A., Gamez, P., Belle, C., Selmeczi, K., & Reedijk, J. (2006). Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chemical Society Reviews*, 35(9), 814-840.
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1466-1472.
- Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan thymus satureioides extracts. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(6), 2132-2139.

- Lee, S. Y., Baek, N., & Nam, T. G. (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 1-13.
- Li, X., Xie, H., Jiang, Q., Wei, G., Lin, L., Li, C., & Liu, Y. (2017). The mechanism of (+) taxifolin's protective antioxidant effect for •OH-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cellular & molecular biology letters*, 22(1), 31.
- Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019). Quinoa Secondary Metabolites and Their Biological Activities or Functions. *Molecules*, 24(13), 2512.
- Liu, H., Zhu, Y., Wang, T., Qi, J., & Liu, X. (2018). Enzyme-Site Blocking Combined with Optimization of Molecular Docking for Efficient Discovery of Potential Tyrosinase Specific Inhibitors from Puerariae lobatae Radix. *Molecules*, 23(10), 2612.
- Liu, J. (2019). Quinoa. *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*, 207-216.
- Liu-Smith, F., & Meyskens, F. L. (2016). Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Molecular nutrition & food research*, 60(6), 1264-1274.
- Luthria, D., & Mukhopadhyay, S. (2006). Influence of Sample Preparation on Assay of Phenolic Acids from Eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 41-47.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82(3), 409-416.
- Muñoz, K., Londoño, J. A., Arango, G. J., Sierra, J. A., & Bravo, K. E. (2007). Efecto de la técnica de extracción de ruta graveolens sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. *Vitae*, 14(2), 78-83.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(2), 23-28.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.

- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., & Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(9), 805-816.
- Plumb, G. W., Price, K. R., & Williamson, G. (1999). Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. *Redox Report*, 4(3), 123-127.
- Promden, W., Viriyabancha, W., Monthakantirat, O., Umehara, K., Noguchi, H., & De-Eknankul, W. (2018). Correlation between the potency of flavonoids on mushroom tyrosinase inhibitory activity and melanin synthesis in melanocytes. *Molecules*, 23(6), 1403.
- Repo de Carrasco, R., & Encina Zelada, C. R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revista de la sociedad química del Perú*, 74(2), 85-99.
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J. M., & Mattila, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120(1), 128-133.
- Rho, H. S., Ghimeray, A. K., Yoo, D. S., Ahn, S. M., Kwon, S. S., Lee, K. H., & Cho, J. Y. (2011). Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 16(4), 3338-3344.
- Ruzza, P., Serra, P. A., Fabbri, D., Dettori, M. A., Rocchitta, G., & Delogu, G. (2017). Hydroxylated biphenyls as tyrosinase inhibitor: A spectrophotometric and electrochemical study. *European journal of medicinal chemistry*, 126, 1034-1038.
- Saeedi, M., Eslamifar, M., & Khezri, K. (2019). Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 582-593.
- San Miguel-Chávez, R. (2017). Phenolic antioxidant capacity: a review of the state of the art. *Phenolic Compounds-Biological Activity*.
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J. H., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.

Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *In Antioxidants. IntechOpen.*

Sarian, M. N., Ahmed, Q. U., So'ad, M., Zaiton, S., Alhassan, A. M., Murugesu, S., & Latip, J. (2017). Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *BioMed research international.*

Sariri, R., Sabbaghzadeh, R., & Poumohamad, F. (2011). In-vitro antioxidant and anti-tyrosinase activity of methanol extracts from *Crocus sativus* flowers. *Pharmacologyonline*, 3, 1-11.

Scanlin, L., Arvada, Stone, M., & Collins, F. (2009). *US Patente n° US 7,563,473 B2.*

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *Journal of functional foods*, 18, 782-796.

Shahidi, F., & Yeo, J. (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1573.

Sharma, U. K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H. P., & Sinha, A. K. (2007). Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(2), 374-379.

Singh, D. (2019). *Quinoa (CHENOPODIUM QUINOA WILLD)*. India: Scientific Publishers.

Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 1-27.

Sulekha, M., Satish, Y., Sunita, Y., & Nema, R. K. (2009). Antioxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104.

Sunitha, D. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14-32.

Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103(2), 381-388.

Tejeda, L., Penarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Åkesson, B., & Bergenståhl, B. (2008). Determination of total antioxidant capacity and total phenolic compounds in andean grains (quinua, cañihua, amaranth and qentu). *Revista Boliviana de Química*, 25(1), 70-74.

TH Khan, M. (2012). Novel tyrosinase inhibitors from natural resources—their computational studies. *Current medicinal chemistry*, 19(14), 2262-2272.

Tian, X., & Schaich, K. M. (2013). Effects of molecular structure on kinetics and dynamics of the trolox equivalent antioxidant capacity assay with ABTS+•. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5511-5519.

Tsang, C. (2004). *Antioxidant activity, protective effects and absorption of polyphenolic compounds*. Doctoral dissertation, University of Glasgow.

Valencia Avilés, E., Figueroa, I. I., Sosa Martínez, E., Bartolomé Camacho, M. C., Martínez Flores, H. E., & García Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas.

Valencia, Z., Cámara, F., Ccapa, K., Catacora, P., & Quispe, F. (2017). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua peruana (*Chenopodium quinoa* W.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(1), 16-29.

Vega-Gálvez, A., Miranda, M. V., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(5), 2541-2547.

Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*, 14, 1-6.

Vyas, S., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2015). Comparative analysis of phenolic contents and total antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam. *Pharmacognosy Journal*, 7(1).

Wagle, A., Seong, S. H., Joung, E. J., Kim, H. R., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2018). Discovery of a Highly Potent Tyrosinase Inhibitor, Luteolin 5-O- β -d-Glucopyranoside, Isolated from *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum., Korean Thistle: Kinetics and Computational Molecular Docking Simulation. *ACS Omega*, 3(12), 17236-17245.

Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111.

Yang, R., Guan, Y., Wang, W., Chen, H., He, Z., & Jia, A. Q. (2018). Antioxidant capacity of phenolics in *Camellia nitidissima* Chi flowers and their identification by HPLC Triple TOF MS/MS. *PloS one*, 13(4).

Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: a phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.

Zhang, H., Wang, C., Shen, S., Wang, G., Liu, P., Liu, Z., & Deng, Z. (2012). Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules*, 17(12), 14037-14045.

Zhu, N., Sheng, S., Li, D., LaVoie, E. J., Karwe, M. V., Rosen, R. T., & HO, C. T. (2001). Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Lipids*, 8(1), 37-44.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 279-309.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 279-309.





ANEXOS

ANEXO 1.1. MÉTODOS PARA ANÁLISIS PROXIMAL

Anexo 1.1.1. Determinación de Humedad

IBNORGA

NORMA BOLIVIANA

NB 312026

Cereales – Quinua en grano – Determinación de humedad

1 OBJETO

Esta norma tiene por objeto determinar el contenido de humedad de los granos de quinua.

2 CAMPO DE APLICACION

Esta norma se aplica a todas las variedades de los granos de quinua bruta, quinua beneficiada, harina de quinua y sus derivados.

3 REFERENCIAS

- NB 052 Cereales – Toma de muestras
- NB 312003 Cereales – Quinua en grano – Definiciones
- NB 312004 Cereales – Quinua en grano – Clasificación y requisitos

4 DEFINICIONES

Para los fines consiguientes, esta Norma tomara la siguiente definición:

4.1 Humedad

Se considera como humedad en los granos de quinua, el agua contenida en los granos de quinua, la que pierde cuando se calienta a una temperatura determinada.

5 METODO DE ENSAYO

5.1 Principio del Método

Se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en una estufa de aire.

5.2 Equipos y Materiales

Los equipos y materiales necesarios son detallados a continuación.

5.2.1. Balanza analítica

Con una sensibilidad de 0,1 mg

5.2.2 Molino de cereales

Molino de cuchillas apropiado. Si no se cuenta con el molino puede utilizarse el molino de porcelana.

5.2.3 Estufa de secado

Estufa con circulación de aire y regulación de la temperatura.

5.2.4 Pesa substancias

Capsulas de aluminio con tapa y fondo plano de 40 mm de diámetro para 5 g de muestra o 55 mm de diámetro para 10 g de muestra. Pesa substancias de vidrio con tapa esmerilada.

5.2.5 Desecador

Provisto de un deshidratante o desecante.

NOTA:

No es recomendable el uso de cloruro de calcio por su insuficiente capacidad de absorción de agua.

5.2.7 Pinzas

Pueden ser metálicas para utilizar en el manipuleo de los pesa substancias.

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez obtenida la muestra correspondiente según NB 052 realizar la molienda rápidamente para evitar cambios apreciables en el contenido de humedad, la muestra debe molerse hasta alcanzar una muestra de granulometría uniforme.

7 PROCEDIMIENTO

El análisis se realizará simultáneamente por duplicado.

- Secar en la estufa a $104 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 30 min los pesa substancias con sus respectivas cubiertas, después enfriarlas a temperatura ambiente en el desecador, seguidamente pesar los recipientes y sus cubiertas al 0,1 mg..
- En los recipientes ya tarados, pesar alrededor de 5 g a 10 g de muestra previamente preparada, extenderla uniformemente sobre toda la base y volver a pesar los pesa substancias destapados dentro de la estufa previamente calentada a $105 \text{ } ^\circ\text{C}$, así como las tapas, durante 3 h.
- Para retirar de la estufa los pesa substancias (deben ser tapados todo) sus respectivas cubiertas, se los transfiere al desecador y se pesan tan pronto como haya alcanzado la temperatura ambiente, toda operación de traslado de los recipientes debe ser efectuada con pinzas, evitando en lo posible el contacto con las manos.
- Repetir el secado nuevamente por una hora en las mismas condiciones anteriores, una vez enfriadas la muestra volver a pesar.
- Se repite este proceso hasta que la diferencia de entre dos pesadas sucesivas sea constante.
- No se debe colocar al mismo tiempo las muestras húmedas junto con las muestras secas, debido a la absorción de la humedad del ambiente por las muestras secas.

8 EXPRESION DE RESULTADOS

El contenido de humedad presente en la muestra de quinua se expresa en porcentaje de masa y se calcula mediante la siguiente formula:

$$H = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} * 100$$

Donde:

- H = Humedad en % (en masa)
- M₀ = Peso del recipiente vacío con su tapa en g.
- M₁ = Peso del recipiente y su tapa, con la muestra sin secar en g.
- M₂ = Peso del recipiente con su tapa, con la muestra seca en g.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones realizadas simultáneamente, la diferencia entre las dos determinaciones no debe ser mayor a 0,2 %, si dicha diferencia supera este límite, el ensayo deberá ser repetido.

9 INFORME

En el informe deberá indicarse:

- El nombre y/o número de muestra, cualquier otra identificación que caracterice correctamente la muestra.
- El contenido deberá expresarse en porcentaje de masa de la muestra seca hasta el segundo decimal.
- Indicar cualquier modificación que se haya hecho en el método, y las razones técnicas para dichos cambios.

10 BIBLIOGRAFIA

La presente norma fue elaborada en base a las siguientes referencias:

- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists "AOAC". USA Met 945.15 16th Ed.
- Manual de métodos de análisis físico-químicos de alimentos, aguas y suelos. Instituto de Salud Pública de Chile Julio, 1998.

Anexos 1.1.2. Determinación de Cenizas

IBNORCA

NORMA BOLIVIANA

NB 312030

Cereales – Quinua en grano – Determinación de cenizas

1 OBJETO

Esta norma tiene por objeto determinar el contenido de cenizas en los granos de quinua.

2 CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma se aplica a todas las variedades de los granos de quinua bruta, quinua beneficiada, harina de quinua y sus derivados.

3 REFERENCIAS

NB 052 Cereales – Toma de muestras
NB 312003 Cereales – Quinua en grano – Definiciones
NB 312004 Cereales – Quinua en grano – Clasificación y requisitos

4 DEFINICIONES

Para los fines consiguientes de esta norma se aplicara la siguiente definición:

4.1 Ceniza

Es el residuo inorgánico o mineral total obtenido después de la calcinación de la muestra de granos de quinua.

5 METODO DE ENSAYO

5.1 Principio del método

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la quinua por calcinación y determinación gravimétrica del residuo.

5.2 Equipos y Materiales

Los equipos y materiales necesarios son detallados a continuación.

5.2.1 Balanza analítica

Con una sensibilidad de 0,1 mg.

5.2.2 Molino de Cereales

Molino de cuchillas apropiado. Si no se cuenta con el molino puede utilizarse un molino de porcelana.

5.2.3 Mufia eléctrica

Que tenga un sistema regulador de temperatura de 0 °C a 1000 °C.

5.2.4 Hornilla

Baño de arena, hornilla o manta calefactora para realizar la precalcinación.

5.2.5 Desecador

Provisto de un deshidratador o desecante.

NOTA.

No es recomendable el uso de cloruro de calcio por su insuficiente capacidad de absorción de agua.

5.2.6 Crisoles

Pueden ser de porcelana nueva, cuarzo o platino de 3 cm de diámetro y si es posible con sus respectivas cubiertas.

5.2.7 Pinzas

Pinza metálica de brazo largo apropiada para el manejo de crisoles a alta temperatura de la mufia.

Pinzas metálicas de brazo corto para el manejo de las cápsulas o recipientes a temperatura ambiente.

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez obtenida la muestra correspondiente según NB 052 realizar la molienda rápidamente para evitar cambios apreciables en el contenido de humedad, la muestra debe molerse hasta alcanzar una harina de granulometría uniforme.

6.1 Preparación de los crisoles

Los crisoles o cápsulas limpios deben ser previamente calcinados a una temperatura de 550 °C a 600 °C en la mufia durante 15 minutos, se retiran de la mufia, se dejan enfriar a temperatura ambiente en el desecador y se pesan al 0,1 mg.

7 PROCEDIMIENTO

El análisis se realizará simultáneamente por duplicado. Pesar al 0,1 mg de 2 a 5 g de muestra en los crisoles previamente preparados y tarados como se indica en el punto anterior, extender uniformemente la muestra y realizar una precalcinación en un horno eléctrico o placa calefactora hasta la eliminación de humos.

Colocar las cápsulas o crisoles en la entrada de la mufia, previamente calcinados a 550 °C a 600 °C dejando la puerta abierta, cuando las muestras dejen de arder, colocarlas en el interior de la mufia con ayuda de la pinza metálica de brazo largo. Dejar calcinarse durante cuatro horas como mínimo hasta que el residuo quede prácticamente blanco grisáceo, enfriar los crisoles en la mufia hasta que descienda la temperatura más allá de 200 °C y retirarlos de la mufia al desecador hasta que enfríen a temperatura ambiente.

Pesar rápidamente al 0,1 mg.

8 EXPRESION DE RESULTADOS

El contenido de cenizas presentes en la muestra de quinua se expresa, en porcentaje de masa de la muestra seca y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100$$

Donde:

C	=	Cenizas en % (en masa)
M ₀	=	Masa de envase vacío, en g
M ₁	=	Masa del crisol con la porción de la muestra de ensayo antes de ser calcinado en g.
M ₂	=	Masa del crisol con la porción de ceniza de la muestra de ensayo después de ser calcinado en g.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones realizadas simultáneamente, la diferencia entre las dos determinaciones no debe ser mayor de 0,2 %, si dicha diferencia supera este límite el ensayo debe ser repetido.

9 INFORME

En el informe deberá indicarse:

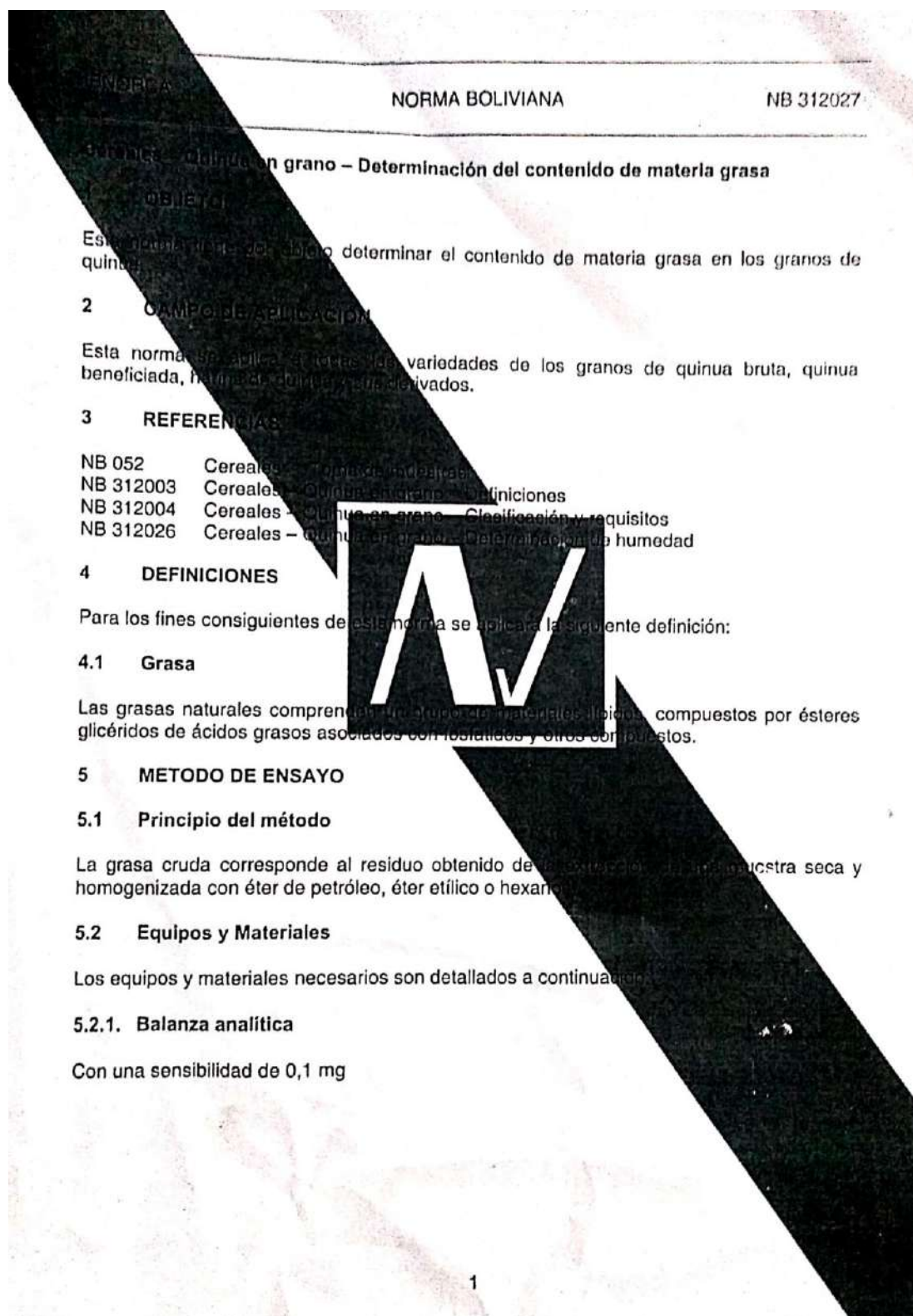
- El nombre y/o número de muestra, cualquier otra identificación que caracterice correctamente la muestra.
- El contenido deberá expresarse en porcentaje de masa de la muestra seca hasta el segundo decimal.
- Indicar cualquier modificación que se haya hecho en el método, y las razones técnicas para dichos cambios.

10 BIBLIOGRAFIA

La presente norma fue elaborada en base a las siguientes referencias:

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, AOAC
USA
Met 32.1.05 16th Ed.

Anexo 1.1.3. Determinación de contenido de materia Grasa



5.2.4 Molino de cereales

Provisto de cribillas apropiado. Si no se cuenta con el molino puede utilizarse un mortero de porcelana.

5.2.5 Estufa de secado

Equipada con circulación de aire y regulación de la temperatura.

5.2.6 Desecador

Provisto de un agente desecante.

NOTA.

No es recomendable utilizar cloruro de calcio por su insuficiente capacidad de absorción de agua.

5.2.5 Extractor Soxhlet

Equipado con balones de 200 ml de capacidad.

5.2.6 Hornilla eléctrica

Provista de un sistema de regulación de temperatura.

5.2.7 Papel filtro

Whatman N° 2 de 150 mm de diámetro o de similar calidad.

5.3 Reactivos.

5.3.1 Éter de Petróleo, éter

Calidad p.a. (pueden utilizarse los reactivos analíticos reemplazados, en este caso se debe realizar la prueba en blanco)

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez obtenida la muestra correspondiente según el método de muestreo, se debe realizar la molienda rápidamente para evitar cambios apreciables en el contenido de materia grasa. La muestra debe molerse hasta alcanzar una harina de granulometría uniforme.

6.1 Preparación del balón recolector de grasa

Secar los balones de extracción en la estufa a 105°C durante 30 minutos, se deben enfriar a temperatura ambiente en el desecador y se pesan al 0,1mg.

7 PROCEDIMIENTO

Pesar al 0,1mg de 3 a 5 g de muestra en el papel filtro, envolviendo en la muestra de manera tal que se evite la pérdida de materia, nuevamente se envuelve en un segundo papel filtro en un segundo papel filtro siguiendo el método descrito en las figuras del Anexo.

Se introduce el cartucho preparado con la muestra en el extractor Soxhlet y se introduce el balón recolector de grasa 200 ml de reactivo (éter de petróleo, etílico o hexano).

... extracción por un tiempo de 5 a 6 horas, verificando que el solvente gotee desde el centro del cartucho a una velocidad no menor de 150 gotas por hora. Se debe mantener constante el volumen del solvente durante la extracción. Se debe verificar las cantidades de solvente cuando se compruebe que parte del mismo se ha evaporado.

... destilación.

El extracto obtenido en la operación de recolección se lleva a la estufa a una temperatura de 100 °C durante 24 horas hasta que la operación hasta que su peso sea constante.

Enfriar el balón de recolección a temperatura ambiente en el desecador y pesar al 0,1 mg.

Todas las operaciones de realización del balón deben realizarse con la ayuda de una pinza metálica o de madera, evitando de lo posible el contacto con las manos.

8 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El contenido de materia grasa presente en la muestra de quinua se expresa, en porcentaje de masa de la muestra seca, se calcula mediante la siguiente fórmula:

EMG=

$$\frac{M_2 - M_1}{M} \cdot 100$$

donde:

- EMG = Extracto de materia grasa en g. por g. de muestra
- M₁ = Masa del balón de recolección vacío, en g.
- M₂ = Masa del balón mas el extracto de materia grasa obtenido en g.
- M = Masa de la muestra analizada en g.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones realizadas simultáneamente, la diferencia entre las dos determinaciones debe ser mayor de 0,2 %, si dicha diferencia supera este límite el ensayo debe ser repetido.

8.1 Utilización de solventes orgánicos de grado técnico

En caso de utilizar solventes de calidad diferente a la que se debe utilizar, se debe ser acompañados simultáneamente por una prueba en blanco, es decir, un extracto de materia grasa se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{EMG} = \frac{(M_2 - M_1) - (M_0 - M_3)}{M} \cdot 100$$

Extracto de materia grasa, en % (en masa)

Masa del balón de recolección vacío utilizado como blanco, en g.

Masa del balón de recolección vacío, en g.

Masa del balón más el extracto de materia grasa obtenido en g.

Masa del balón más las impurezas del solvente utilizado como blanco g.

Masa de la muestra analizada en g.

Masa del extracto de materia grasa obtenida, en g.

Masa de las impurezas del solvente, en g.

9 INFORMACIÓN

En el informe debe incluirse:

- El nombre de la muestra, cualquier otra identificación que caracterice correctamente la muestra.
- El contenido de materia grasa en porcentaje de masa de la muestra seca hasta el segundo decimal.
- Indicar cualquier modificación que se haya hecho en el método, y las razones técnicas para dichos cambios.

10 BIBLIOGRAFIA

La presente norma fue elaborada en base a las siguientes referencias:

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists "AOAC"
USA

Vol 2, Met. 945.38 (see 920.39 C). 15th Ed.

Manual de métodos de análisis físico-químicos de alimentos líquidos y sólidos.
Instituto de Salud Pública de Chile
Julio, 1998.

Anexo 1.1.4. Determinación de Proteína

Quinoa Real Blanca

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Instituto de Ecología
Laboratorio de Calidad Ambiental



Informe de Ensayo: MO 17/16

Página 1 de 3

INFORME DE ENSAYO EN MATERIA ORGÁNICA MO 17/16

Cliente:	UMSA
Solicitante:	Lic. Lily Salcedo Ortiz
Dirección del cliente:	Villa Copacabana, C/Samuel Oropeza # 1329
Procedencia de la muestra:	La Paz
	Provincia: Murillo
	Departamento: La Paz
Punto de muestreo:	Laboratorio BO-2
Responsable del muestreo:	Lic. Lily Salcedo Ortiz
Fecha de muestreo:	28 de julio de 2016
Hora de muestreo:	10:00
Fecha de recepción de la muestra:	03 de agosto de 2016
Fecha de ejecución del ensayo:	Del 03 al 15 de agosto, 2016
Caracterización de la muestra:	Harina de quinoa
Tipo de muestra:	Simple, 2 g
Envase:	Viales
Código LCA:	17 - I
Código original:	Q 1

Resultado de Análisis

Parámetro	Método	Unidad	Límite de determinación	17 - I Q 1
Nitrógeno total	ASPT-88	%	0,0030	2,4

Los resultados de este informe no deben ser modificados sin la autorización del LCA.
La difusión de los resultados debe ser en su integridad.

La Paz, agosto 18 de 2016

c.c.: Aren.
JCH/LCA

Campus Universitario: Calle 27, Cota Cota * Casilla 1007 Correo Central * Telf/Fax: 2772522
Email: lca_ie@yahoo.com - Web: lca.umsa.bo * La Paz - Bolivia

Nota: Proteína = Nitrógeno total x 6.25

Anexo 1.1.4. Determinación de Proteína

Quinoa Jacha Grano

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Instituto de Ecología
Laboratorio de Calidad Ambiental



Informe de Ensayo: MO 28/17

Página 2 de 12

INFORME DE ENSAYO EN HARINAS MO 28/17

Cliete: FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
UMSA
Solicitante: Msc. Lily Salcedo Ortiz
Dirección del cliente: Cota Cota C/27, Instituto de Investigaciones Químicas
Procedencia de la muestra: No especificado
Provincia: Murillo
Departamento: La Paz
Instituto de Investigaciones Químicas
Punto de muestreo: Msc. Lily Salcedo Ortiz
Responsable del muestreo: Msc. Lily Salcedo Ortiz
Fecha de muestreo: 24 de noviembre, 2017
Hora de muestreo: 11:50
Fecha de recepción de la muestra: 24 de noviembre, 2017
Fecha de ejecución del ensayo: Del 24 de noviembre al 07 de diciembre, 2017
Caracterización de la muestra: Harina de Quinoa Jacha
Tipo de muestra: Simple
Envase: Frasco de Vidrio 1g.
Código LCA: 28-2
Código original: Harina Quinoa Jacha

Resultado de Análisis

Parámetro	Método	Unidad	Límite de determinación	Harina Quinoa Jacha 28-2
Proteína cruda	NFTA 3.1	%	0,0630	13

Los resultados de este informe no deben ser modificados sin la autorización del LCA.
La difusión de los resultados debe ser en su integridad.

La Paz, Diciembre 07 de 2017



c.c.: Arch.
JCH/LCA



Campus Universitario: Calle 27 de Cota Cota, La Paz, Telf./Fax: 2772522
Casilla Correo Central 10077, La Paz - Bolivia

Anexo 1.1.5. Determinación de Fibra Cruda

ENORMA

NORMA BOLIVIANA

NB 312028

Cereales - Quinua en Grano - Determinación de Fibra Cruda

1. OBJETO

Esta Norma tiene por objeto determinar el contenido de fibra cruda de los granos de quinua.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma se aplica a todas las variedades de los granos de quinua bruta, quinua beneficiada, harina de quinua y sus derivados.

3. REFERENCIAS

NB 052	Cereales - Toma de muestras
NB 312003	Cereales - Quinua en grano - Definiciones
NB 312004	Cereales - Quinua en grano - Clasificación y requisitos
NB 312026	Cereales - Quinua en grano - Determinación de humedad
NB 312029	Cereales - Quinua en grano - Determinación del contenido de materia grasa

4. DEFINICIONES

Para los fines consiguientes de esta Norma se aplica la siguiente definición:

4.1 Fibra Cruda

Es el residuo insoluble obtenido después de someter la muestra a una hidrólisis ácida y posteriormente a una hidrólisis básica.

5. METODO DE ENSAYO

5.1 Principio del Método

Es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas.

5.2 Equipos y Materiales

Los equipos y materiales necesarios son detallados a continuación.

5.2.1 Balanza Analítica

Con una sensibilidad de 0,1 mg.

5.2.2. Molino de Cereales

Molino de cuchillas apropiado. Si no se cuenta con el molino puede utilizarse un molino de porcelana.

5.2.3 Sistema de Reflujo

Aparato de calentamiento a reflujo.

5.2.4 Hornilla Eléctrica

Placa calefactora con un sistema adecuado para la regulación de temperatura

5.2.5 Bomba de Vacío

Se recomienda la infiltración al vacío por ser más rápida y efectiva.

5.2.5.1 Matraz Kivasato

Con una capacidad de 500 ml a 1000 ml Para conectar a la bomba de vacío.

5.2.6 Crisoles de Gooch y embudo Büchner

De porcelana cuya abertura de sus orificios tenga un diámetro de 1 mm.

5.2.7 Estufa de Secado

Con sistema para la regulación de temperatura

5.2.8 Desecador

Provisto de un deshidratante o desecante

NOTA.

No es recomendable el uso de cloruro de calcio, sulfato de sodio, sulfato de aluminio, de agua.

5.2.9 Mufia

Con un sistema regulador de temperatura de 550 °C a 600 °C

5.2.10 Pinzas

Metálicas, para el manipuleo de las cápsulas o recipientes

5.2.11 Papel pH

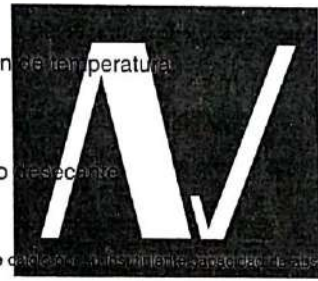
Que indique el grado de acidez y basicidad.

5.2.12 Asbesto o amianto

Previamente tratado.

5.3 Reactivos

Los reactivos a utilizarse se detallan a continuación



5.3.1. Silicona antiespumante**5.3.2. Solución de ácido sulfúrico**

0,255 N Preparado a partir de ácido sulfúrico concentrado calidad p.a.

5.3.3. Solución de hidróxido de sodio

0,313 N Preparado a partir de hidróxido de sodio sólido de calidad p.a. libre de carbonatos.

5.3.3. Alcohol etílico

95 % a 96 % en volumen

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez obtenida la muestra correspondiente según NB 052 realizar la molienda rápidamente para evitar cambios apreciables en el contenido de humedad, la muestra debe molerse hasta alcanzar una malla de granulometría uniforme que pase por la malla de 1 mm.

7 PROCEDIMIENTO

El análisis se realizará simultáneamente por duplicado.

Desgrasar la muestra de ensayo según 7 de la NB 312029, en su defecto pesar al 0,1 mg. 2 g. de muestra proveniente del residuo de la extracción de grasas según la NB 312029.

Se transfiere la muestra junto con 0,5 g. de asbesto procesado a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml y agregar 200 ml de la solución caliente de ácido sulfúrico 0,255 N, unas gotas de antiespumante y perlas de ebullición.

Proceder a la digestión a temperatura de ebullición durante 30 minutos en el sistema de reflujo evitando la formación de espuma y agitando periódicamente el matraz Erlenmeyer con un suave movimiento circular, para evitar que se pegue material adherido a las paredes.

Una vez transcurridos los 30 minutos de digestión ácida en caliente, filtrar en el embudo Buchner el residuo filtrado debe ser lavado en el mismo sistema de filtración, con agua destilada caliente hasta que el agua proveniente de los lavados no presente reacción ácida.

El residuo sólido obtenido de la hidrólisis ácida debe ser trasvasado nuevamente al matraz Erlenmeyer en forma cuantitativa, con la ayuda de 200 ml de la solución de hidróxido de sodio 0,313 N caliente dejando en digestión nuevamente a temperatura de ebullición durante 30 minutos. Agregar unas gotas de antiespumante si es necesario.

Filtrar nuevamente a través del crisol de Gooch preparado con amianto, el residuo filtrado debe ser lavado en el mismo sistema de filtración con agua destilada caliente hasta que el agua proveniente de lavados no presente reacción básica.

El residuo de la digestión ácida básica debe ser lavado con etanol, en el mismo sistema de filtración.

Secar los crisoles de Gooch en la estufa a $130^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 h, retirar de la estufa y dejar enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador y pesar al 0,1 mg.

Calentar los crisoles en una mufla e incinerar a temperatura de $600^{\circ} \pm 15^{\circ}\text{C}$, calcinar hasta la eliminación total de las partículas carbonosas (cenizas blancas). Retirar los crisoles de la mufla, dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador y pesar inmediatamente con aproximación de 0,1 mg.

8 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El contenido de fibra cruda presente en la muestra de quinua se expresa en porcentaje de masa de la muestra seca y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{M_1 - M_2}{M} \cdot 100$$

donde:

- FC = Fibra cruda, en % (en masa)
- M = Es el peso de la muestra en g.
- M₁ = Peso del crisol más el residuo después del secado, en g.
- M₂ = Peso del crisol más las cenizas después del calcinado, en g.
- M₁ - M₂ = Peso de residuo de fibra cruda, en g.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones realizadas simultáneamente, la diferencia entre las dos determinaciones no debe ser mayor a 0,2 %, si dicha diferencia supera este límite el ensayo deberá ser repetido.

9 INFORME

En el informe deberá indicarse:

- El nombre y/o número de muestra, cualquier otra identificación que caracterice correctamente la muestra.
- El contenido deberá expresarse en porcentaje de masa de la muestra seca hasta el segundo decimal.
- Indicar cualquier modificación que se haya hecho en el método y las razones técnicas para dichos cambios.

10 BIBLIOGRAFIA

La presente norma fue elaborada en base a las siguientes referencias:

Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC),
USA 1990
Met. 945.38 (see 962.09 E) 15th Ed.

Manual de métodos de análisis físico-químicos de alimentos, aguas y suelos
Instituto de Salud Pública de Chile
Julio, 1998.

Anexo 1.1.6. Determinación de Hidratos de Carbono

Cereales – Quinoa en grano – Determinación de hidratos de carbono**1 OBJETO**

Esta norma tiene por objeto determinar el contenido de hidratos de carbono en los granos de quinoa.

2 CAMPO DE APLICACION

Esta norma se aplica a todas las variedades de los granos de quinoa bruta, quinoa beneficiada, harina de quinoa y sus derivados.

3 REFERENCIAS

NB 052	Cereales – Toma de muestras
NB 312003	Cereales – Quinoa en grano – Definiciones
NB 312004	Cereales – Quinoa en grano – Clasificación y requisitos

4 DEFINICIONES

Para los fines consiguientes de esta norma se aplicará la siguiente definición:

4.1 Hidratos de carbono

Se define como hidratos de carbono a un grupo de sustancias orgánicas no nitrogenadas como los almidones, dextrinas, azúcares solubles, parte de la celulosa, pentosanos, pectinas, gomas y otros.

5 METODO DE ENSAYO**5.1 Principio del método**

Determinación indirecta de la diferencia de 100 de la suma de los porcentajes en masa seca de las proteínas totales, fibra cruda, materia grasa, cenizas y humedad.

6 PROCEDIMIENTO

Una vez obtenidos los resultados de proteínas totales, fibra cruda, materia grasa, cenizas y humedad, se realiza el cálculo indirecto de la diferencia de 100 de la sumatoria de los porcentajes de los parámetros mencionados anteriormente.

La cifra obtenida se considera el porcentaje de hidratos de carbono en la muestra de quinoa.

8 EXPRESION DE RESULTADOS

El contenido de hidratos de carbono presentes en la muestra de quinoa se expresa en porcentaje del peso de la muestra y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$HC = 100 - (P + EMG + FC + C + H)$$

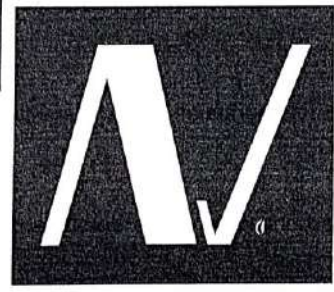
Donde:

HC	=	Hidratos de carbono, en % (en masa)
P	=	Proteínas, en % (en masa)
EMG	=	Extracto de materia grasa, en % (en masa)
FC	=	Fibra cruda, en % (en masa)
C	=	Cenizas, en % (en masa)
H	=	Humedad, en % (en masa)

9 INFORME

En el informe deberá indicarse:

- El nombre y/o número de muestra, cualquier otra identificación que caracterice correctamente la muestra.
- El contenido deberá expresarse en porcentaje de masa de la muestra seca hasta el segundo decimal.



ANEXO 1.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Análisis estadístico para el Análisis Proximal de ambas variedades

Componente	Variedad	Media	Sig.	Análisis
Humedad	HQRB	10,673	,000	Existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	11,380		
Cenizas	HQRB	2,370	,000	Existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	2,917		
Grasa	HQRB	5,700	,088	No existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	6,500		
Proteína	HQRB	15,000	,000	Existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	13,033		
Fibra	HQRB	3,067	,484	No existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	3,013		
Carbohidratos	HQRB	63,100	,196	No existe diferencia entre las dos variedades
	HQJG	63,190		

Si el ANOVA $p \leq 0.05$, existe diferencias significativas entre variedades

ANEXO 1.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS (GH) - MÉTODO PH STAT

Grado de hidrólisis para las dos variedades de quinua con la enzima Alcalasa

Tiempo (min)	QRB	QJG
	% GH	% GH
5	11,05 ± 0.03	11,07 ± 0.06
10	15,30 ± 0.04	15,25 ± 0.03
15	17,88 ± 0.05	17,73 ± 0.01
20	19,38 ± 0.06	19,59 ± 0.05
25	20,62 ± 0.02	20,48 ± 0.06
30	21,58 ± 0.02	21,36 ± 0.05
35	22,18 ± 0.03	22,46 ± 0.06
40	22,92 ± 0.04	22,86 ± 0.05
45	23,30 ± 0.02	23,14 ± 0.07
50	23,75 ± 0.03	23,74 ± 0.03
55	24,14 ± 0.06	23,94 ± 0.03
60	24,64 ± 0.06	24,37 ± 0.02
65	24,98 ± 0.07	24,90 ± 0.07
70	25,34 ± 0.02	25,58 ± 0.07
75	25,72 ± 0.01	25,75 ± 0.03
80	25,92 ± 0.08	25,94 ± 0.01
85	26,10 ± 0.08	26,14 ± 0.01
90	26,10 ± 0.08	26,14 ± 0.01
95	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01
100	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01
105	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01
110	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01
115	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01
120	26,20 ± 0.08	26,24 ± 0.01

Promedio de tres repeticiones (n=3) ± desviación estándar

ANEXO 1.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS (GH) - MÉTODO PH STAT

Grado de hidrólisis para las dos variedades de quinua con la enzima Flavourzyme

Tiempo (min)	QRB	QJG
	% GH	% GH
5	10,54 ± 0.01	10,59 ± 0.03
10	14,54 ± 0.05	14,65 ± 0.03
15	16,75 ± 0.04	16,30 ± 0.02
20	17,98 ± 0.01	17,69 ± 0.06
25	18,74 ± 0.04	18,55 ± 0.03
30	19,62 ± 0.01	19,74 ± 0.03
35	20,32 ± 0.08	20,44 ± 0.01
40	20,78 ± 0.02	20,91 ± 0.08
45	21,36 ± 0.03	21,49 ± 0.03
50	21,71 ± 0.03	21,84 ± 0.04
55	22,18 ± 0.05	22,28 ± 0.06
60	22,76 ± 0.03	22,83 ± 0.06
65	23,54 ± 0.06	23,41 ± 0.07
70	23,92 ± 0.03	23,99 ± 0.02
75	24,38 ± 0.02	24,46 ± 0.09
80	24,65 ± 0.01	24,72 ± 0.05
85	24,65 ± 0.01	24,72 ± 0.05
90	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
95	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
100	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
105	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
110	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
115	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
120	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02
120	24,95 ± 0.06	24,92 ± 0.02

Promedio de tres repeticiones (n=3) ± desviación estándar

ANEXO 1.4. Protease from *Aspergillus oryzae*

P6110 Sigma-Aldrich

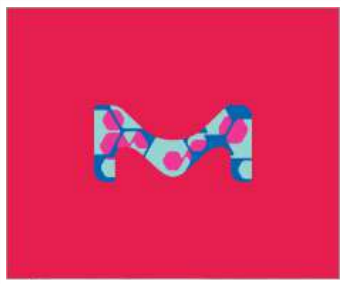
Protease from *Aspergillus oryzae*

≥500 U/g

Synonym: Flavourzyme®

EC Number 232-752-2

MDL number MFCD00132092



SDS Specification Sheet (PDF)

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size	Price (USD/EUR)
---------------	--------------	-----------	-----------------

P6110-50ML	Available to ship on 21.11.19 - FROM50 ML		90.35
P6110-250ML	Available to ship on 21.11.19 - FROM250 ML		252.44

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

Product Recommendations

 <p>P1236 Protease from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> liquid, ≥0.8 U/g</p>	 <p>P0029 Protease from <i>Bacillus</i> sp.</p>	 <p>P2143 Protease from <i>Aspergillus saitoi</i> Type XIII, ≥0.6 unit/mg solid</p>	 <p>P0107 Protease from <i>Rhizopus</i> sp.</p>	 <p>P3111 Protease from <i>Bacillus</i> sp. liquid, ≥16 U/g</p>
---	--	--	---	--

Properties

Related Categories Analytical and Industrial Enzymes, Application Index, Biochemicals and Reagents, Enzymes, Inhibitors, and Substrates, Novozymes: Quality Environmentally-Friendly Enzymes, More...

storage temp. 2-8°C

Description

General description

Fungal protease/peptidase complex produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae* and contains both endoprotease and exopeptidase activities.

Application

Protease is an enzyme used to break down proteins by hydrolyzing peptide bonds. Protease is used to degrade proteins, to study protease inhibitors and to study thermal inactivation kinetics. Protease is used in nucleic acid isolation procedures in incubations. Product P6110 is a fungal protease/peptidase complex produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae*. It has been injected into flies with a nanoject apparatus for infection and survival experiments^[1].

The enzyme from Sigma has been used in the semi-purification of mouse colorectal mucins during protein digestion.^[2]

Packaging

250 mL in glass bottle

Biochem/physiol Actions

Protease catabolizes proteins by hydrolysis of peptide bonds. Protease, from *Aspergillus oryzae*, contains both endoprotease and exopeptidase activities.

Unit Definition

ANEXO 1.5. Protease from *Bacillus licheniformis*

P4860 Sigma-Aldrich

Protease from *Bacillus licheniformis*

≥2.4 U/g


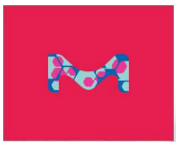



Synonym: Alcalase® 2.4L, Proteinase from *Bacillus licheniformis*, Subtilisin A

CAS Number 9014-01-1 | Enzyme Commission (EC) Number 3.4.21.62 (BRENDA [\[1\]](#) | IUBMB [\[2\]](#)) | EC Number 232-752-2 | MDL number MFCD00132092 | eCI@ss 32160410

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size	Price (USD/EUR)	Similar Products
P4860-50ML	Available to ship on 21.11.19 - FROM50 ML		83.04	
P4860-250ML	Available to ship on 21.11.19 - FROM250 ML		200.40	

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

Product Recommendations

 <p>P5459 Protease from <i>Bacillus licheniformis</i> glycerol solution (50%)</p>	 <p>P5380 Protease from <i>Bacillus licheniformis</i> Type VIII, lyophilized powder, 7-15 units/mg solid</p>	 <p>P3910 Protease from <i>Bacillus licheniformis</i> lyophilized powder, for use in Total Dietary Fiber Assay, TDF-100A</p>	 <p>P1236 Protease from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> liquid, ≥0.8 U/g</p>	 <p>P0029 Protease from <i>Bacillus</i> sp.</p>
--	---	---	--	--

Properties

Related Categories: 3.4.x.x Peptidases, 3.x.x.x Hydrolases, Analytical and Industrial Enzymes, Application Index, Biochemicals and Reagents, More...

form: **aqueous solution**

storage temp.: **2-8°C**

Description

Application

Protease is an enzyme used to break down proteins by hydrolyzing peptide bonds. Protease is used to degrade proteins, to study protease inhibitors and to study thermal inactivation kinetics. Protease is used in nucleic acid isolation procedures in incubations.

The enzyme from Sigma has been used to prepare chicken (leg) bone protein hydrolysates while evaluating ACE inhibitory peptides.^[2] It has also been used for the hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* protein extracts during a study of their antitumor activities.^[1]

Biochem/physiol Actions

Alcalase is an endo-protease of the serine type. It has a broad substrate specificity and can hydrolyze most peptide bonds within a protein molecule. It is active between pH 6.5 and 8.5 and has an optimum temperature of 60 °C. The enzyme is used in detergent formulations to remove protein-based stains.

Protease catabolizes proteins by hydrolysis of peptide bonds. Proteases are inactivated by serine active-site inhibitors, such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and diisopropylfluorophosphate .

Analysis Note

Activity expressed in Anson Units

Legal Information

A product of Novozyme Corp.

Alcalase is a registered trademark of Novozymes Corp.

ANEXO 1.6. Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung

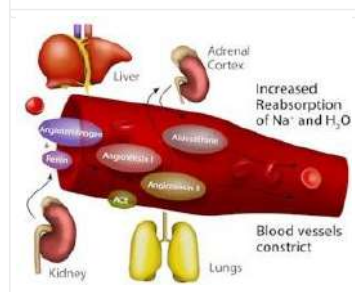
A6778 Sigma-Aldrich

Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung

≥2.0 units/mg protein (modified Warburg-Christian)

Synonym: ACE, Peptidyl-dipeptidase A, Peptidyl-dipeptide Hydrolase

CAS Number 9015-82-1 | Enzyme Commission (EC) Number 3.4.15.1 (BRENDA) | IUBMB | MDL number MFCD00130325 | eCl@ss 42010109



[SDS](#) [Product Information Sheet \(PDF\)](#) [Specification Sheet \(PDF\)](#)

[Similar Products](#)

SKU-Pack	Size	Availability	Pack Size	Price (USD/EUR)
A6778-1UN		Available to ship on 12.12.19 - FROM	0.1 UNIT	78.53
A6778-25UN		Available to ship on 12.12.19 - FROM	0.25 UNIT	144.81
A6778-1UN		Available to ship on 12.12.19 - FROM	1 UNIT	404.37
A6778-2UN		Available to ship on 12.12.19 - FROM	2 UNITS	768.63
A6778-5UN		Available to ship on 12.12.19 - FROM	5 UNITS	1,626.38

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

Product Recommendations

 H1635 N-Hippuryl-His-Leu hydrate powder, ≥98% (HPLC)	 A2580 Angiotensin Converting Enzyme from porci... lyophilized powder, ≥10 units/mg protein (Bradford)	 SAE0075 Angiotensin Converting Enzyme, ACE, huma... recombinant, ≥10 U/mg, expressed in HEK 293 cells	 859052 N-Hippuryl-His-Leu hydrate 99%	 H4884 Hippuryl-His-Leu acetate salt
--	---	---	---	--

Properties

Related Categories	3.4.x.x Peptidases, 3.x.x.x Hydrolases, Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin Metabolism, Biochemicals and Reagents, More...
form	lyophilized powder
shipped in	dry ice
storage temp.	-20°C

Description

General description

The angiotensin-converting enzyme (ACE) is a dipeptidyl-carboxypeptidase which exists in somatic and testicular isoforms with zinc binding motif HEXXH in their active site.^[5] ACE regulates blood pressure through renin-angiotensin system. ACE elevates blood pressure by converting angiotensin I to a key vasoconstrictor angiotensin II and inhibiting a potent vasodilator bradykinin. Inhibition of ACE is a targeted therapeutic strategy for high blood pressure.^{[1][2]} Several ACE synthetic inhibitory peptides available for clinical use include captopril, enalapril and lisinopril.^[1] Currently, developing inhibitory peptides from natural food sources,^{[1][2][4]} or phenolic compounds from plant sources to inhibit ACE is underway.^[3] ACE plays a critical role in fertilization by releasing the proteins anchored to glycosylphosphatidylinositol (GPI) in sperm membrane.^[5]

Application

Angiotensin converting enzyme from rabbit lung has been used:

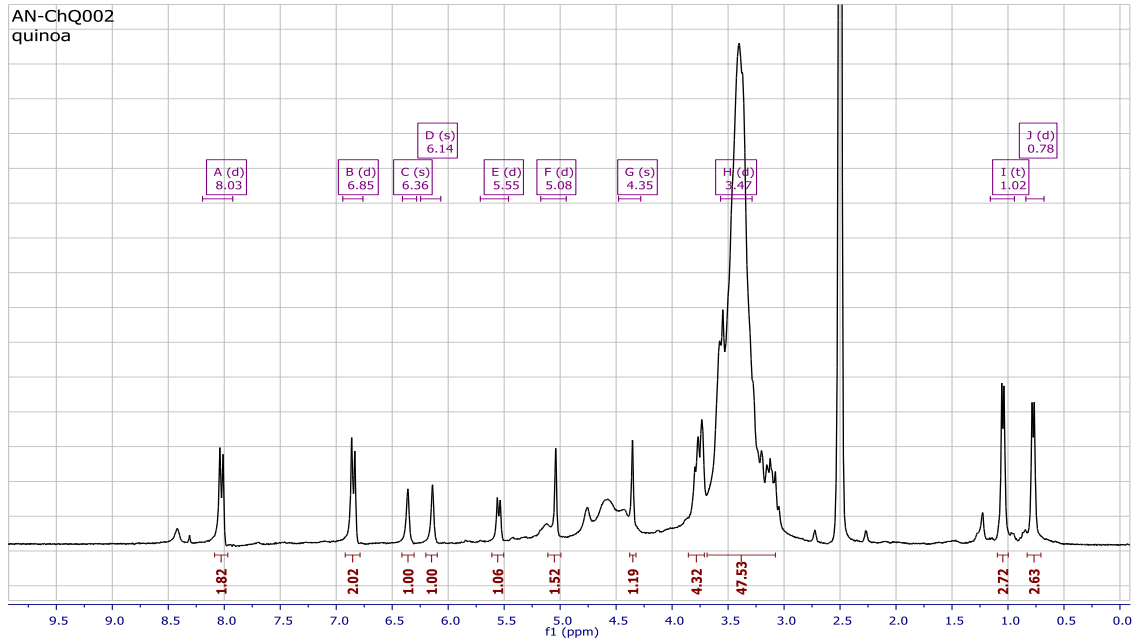
- for measuring inhibitory effect of egg white protein hydrolysates on ACE activity by high performance liquid chromatography (HPLC)^[1]
- to measure the ACE inhibition by litchi pericarp^[3] and cooked chicken breast^[4] using hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) as substrate by reverse phase-HPLC (RP-HPLC)^[3] and HPLC^[4] respectively
- in releasing GPI anchored protein *in vitro* in few cell lines like HeLa, HEK293 and *in vivo* in mice sperm.^[5]

Biochem/physiol Actions

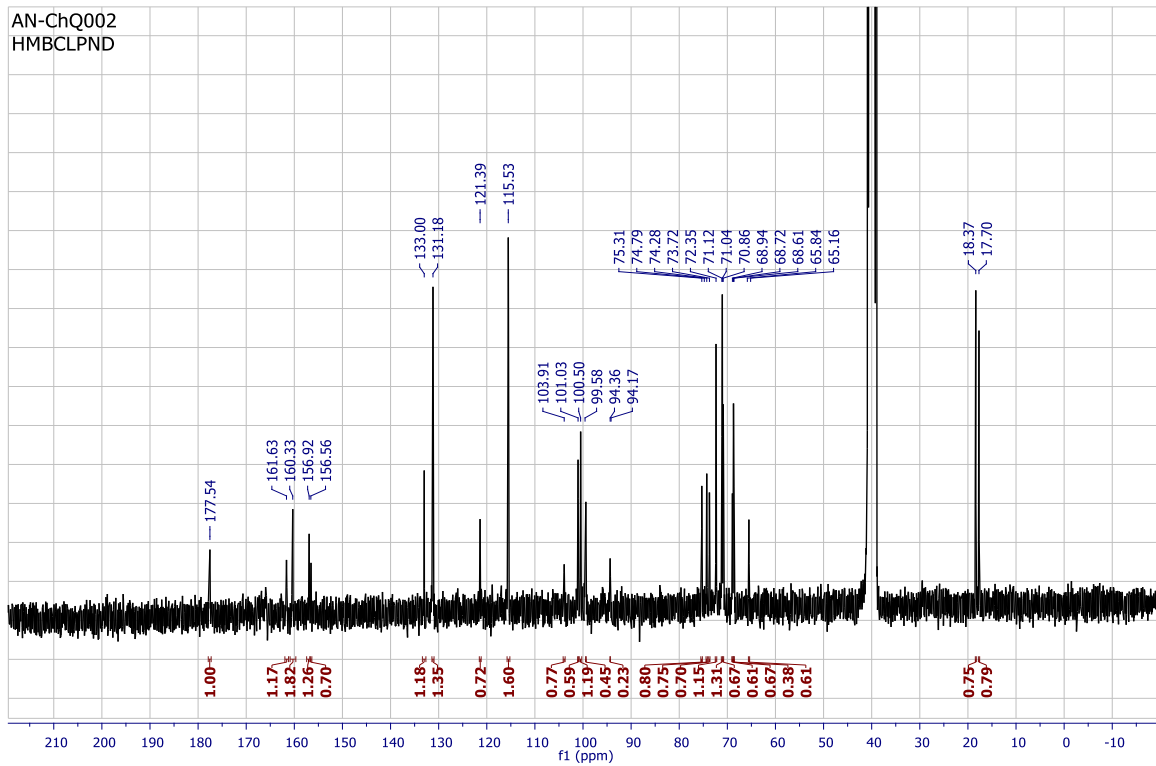
Removes C-terminal dipeptides from susceptible substrates, e.g., angiotensin I and bradykinin.

ANEXO 2.1.

Espectro RMN de ^1H del Mauritianin

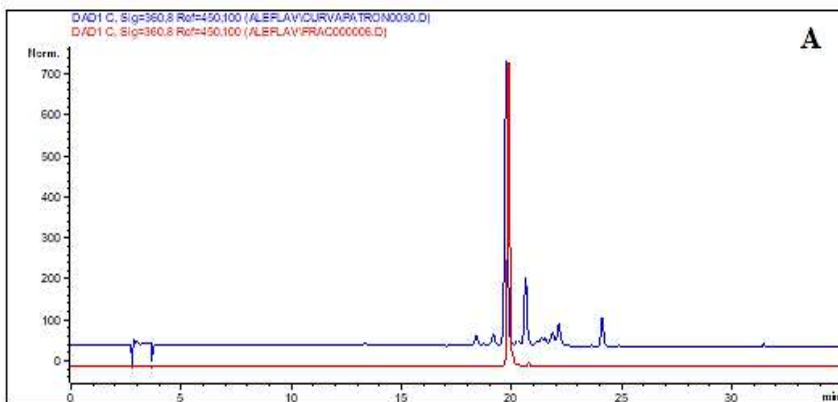


Espectro RMN de ^{13}C del Mauritianin

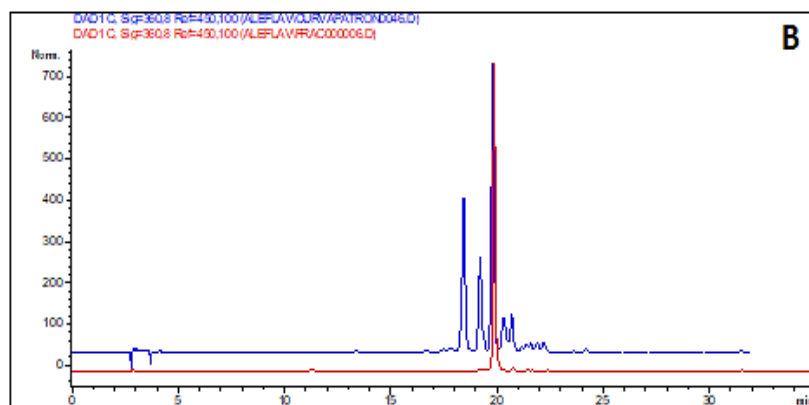


ANEXO 2.2.

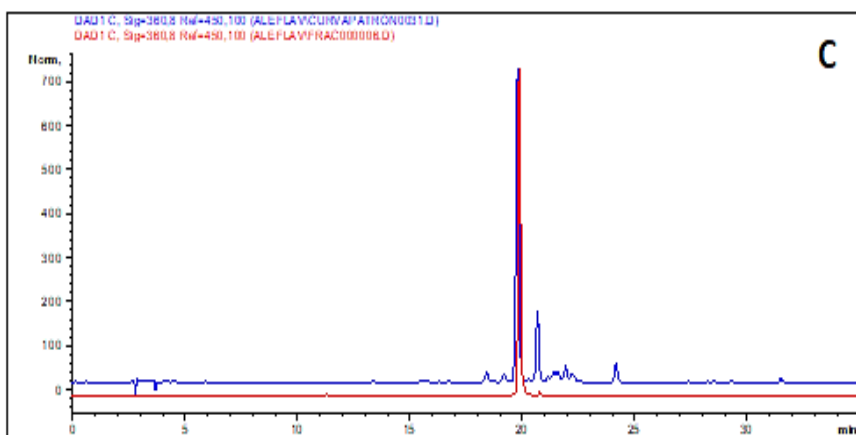
COMPARACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS DEL MAURITIANIN (ROJO) CON LOS CROMATOGRAMAS DE EXTRACTOS DE QUINUA (AZUL)



A) Análisis HPLC del extracto hidroalcohólico de la QJG



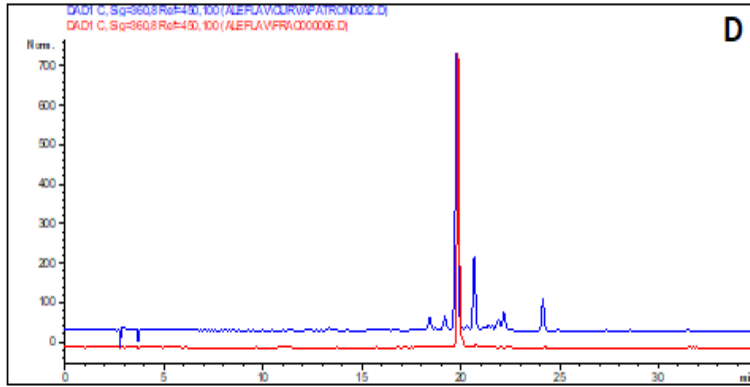
B) Análisis HPLC del extracto hidroalcohólico de la QRB



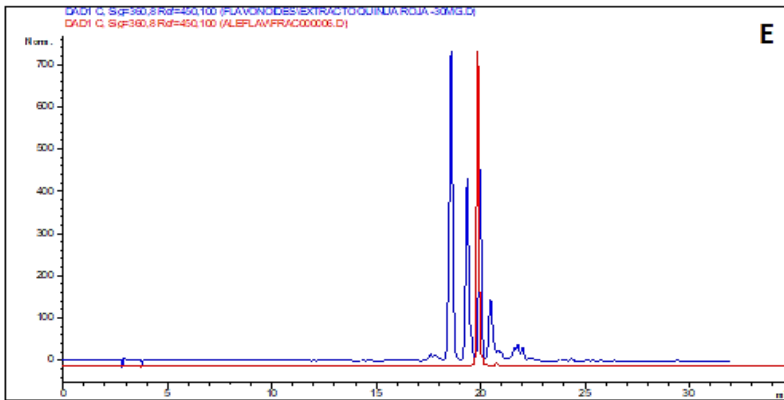
C) Análisis HPLC del extracto AEA-1

ANEXO 2.2.

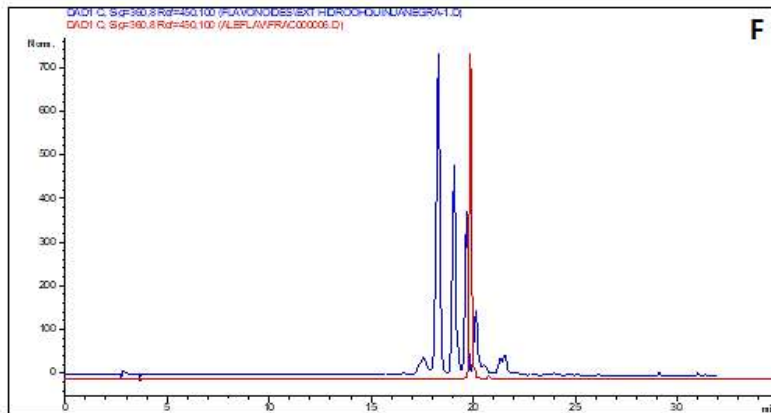
COMPARACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS DEL MAURITIANIN (ROJO) CON LOS CROMATOGRAMAS DE EXTRACTOS DE QUINUA (AZUL)



D) Análisis HPLC del extracto AEA-2



E) Análisis HPLC del extracto hidroalcohólico de la QRR



F) Análisis HPLC del extracto hidroalcohólico de la QRN

ANEXO 2.3. TIROSINASA DE HONGO

7/12/2019

Tyrosinase from mushroom lyophilized powder, ≥1000 unit/mg solid | Polyphenol Oxidase | Sigma-Aldrich

BoViva Home T3824 - Tyrosinase from mushroom

SIGMA-ALDRICH

T3824

Tyrosinase from mushroom

lyophilized powder, ≥1000 unit/mg solid

Synonym: Catechol Oxidase, Monophenol Monooxygenase, Monophenol, dihydroxyphenylalanine oxygen oxidoreductase, Polyphenol Oxidase

CAS Number 9002-10-2 | Enzyme Commission (EC) Number 1.14.18.1 (BRENDA¹) | (UBMB²) | MDL number MFCD00692118



SDS Datasheet (PDF) Specification Sheet (PDF)

Similar Products

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size	Price (USD/EUR)
T3824-25KU	Available to ship on 07.12.19 - FROM	25000 UNITS	110.85
T3824-50KU	Available to ship on 07.12.19 - FROM	50000 UNITS	191.05
T3824-250KU	Available to ship on 07.12.19 - FROM	250000 UNITS	790.85
T3824-500KU	Only 4 left in stock (more on the way) - FROM	500000 UNITS	1,188.49
T3824-1MU	Only 5 left in stock (more on the way) - FROM	1000000 UNITS	1,854.94

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

Product Recommendations



T8455
Tyrosinase Fragment 369-377 human



D9528
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
≥98% (TLC)



MAK257
Tyrosinase Inhibitor Screening Kit (Colo...
sufficient for 100 colorimetric tests



333786
L-Dopa-(p-phenyl-d₃)
≥95 atom % D, ≥98% (CP)



T3754
L-Tyrosine
reagent grade, ≥98% (HPLC)

Properties

Related Categories	1.14.x.x Acting on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen, 1.x.x.x Oxidoreductases, Application Index, Biochemicals and Reagents, Cell Biology, More...
form	lyophilized powder
Featured Industry	Diagnostic Assay Manufacturing
shipped in	wet ice
storage temp.	-20°C

Description

General description
Isoelectric point (pI): 4.7-5
pH optimum is 6-7

Molecular weight: 128 kDa by sedimentation velocity diffusion; 133 kDa by light-scattering measurements, and 119.5 kDa by electrophoresis.

Tyrosinase is a copper-containing oxidase, which has activity for both catechols and cresol. It is responsible for browning reactions. The enzyme is reported to have two binding sites for aromatic substrates and a different binding site for oxygen-copper. The copper is probably Cu(I), with inactivation involving oxidation to Cu(II) ion.

Tyrosinase is a copper-containing oxidase, which has activity for both catechols and cresol. It is responsible for browning reactions. This enzyme is reported to have two binding sites for aromatic substrates and a different binding site for oxygen-copper.

Application

Tyrosinase activity has been assessed in a study that developed an alternative therapeutic agent for treating hyperpigmentation. [1] Tyrosinase has also been used in a study to investigate the oculocutaneous albinism phenotype in the Pakistani population. [1]