



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TEMA:

Caracterización de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).

Trabajo de Titulación. Modalidad: Proyecto de Investigación. Presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Este trabajo es parte del Proyecto "Aislamiento y Caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de amaranto y quinua aprobado en el Honorable Consejo Universitario mediante resolución N.- 1373- CU- P- 2014, financiado por el centro de investigación y desarrollo DIDE. Coordinado por Wilman Ismael Carrillo Terán Ph.D. Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTORA: Mayra Alejandra Toapanta Paredes

TUTOR: Wilman Ismael Carrillo Terán Ph. D. Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Ambato - Ecuador

Abril-2016


APROBACIÓN DEL TUTOR

Wilman Ismael Carrillo Terán

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 25 de febrero de 2016



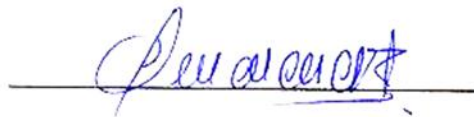
Wilman Ismael Carrillo Terán, Ph. D.

CI. 175708005-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Mayra Alejandra Toapanta Paredes, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas.



Mayra Alejandra Toapanta Paredes

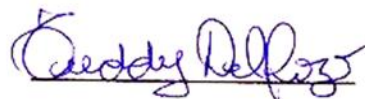
CI. 050385888-8

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores aprueban el presente trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

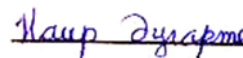
Para Constancia, firman:



Ing. Dr. Freddy Geovanny Del Pozo

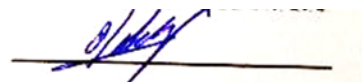
C.I. 180244627-6

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dra. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

CI. 1753479193



Dr. Órestes Darío López Hernández

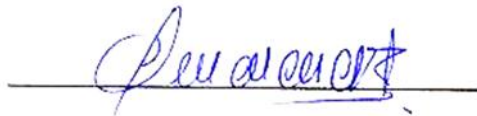
CI.1754784864

Ambato, 13 de Abril de 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Mayra Alejandra Toapanta Paredes

CI. 050385888-8

AUTORA

DEDICATORIA

*“El factor determinante para que nuestra vida sea un paraíso o un infierno,
es siempre nuestra actitud ante las cosas.
Nuestra actitud es la fuerza motriz más importante en todos nosotros, seamos conquistadores o
fracasados”*

Og Mandino

Este trabajo está dedicado para mi familia.

A mi Mami por todo su apoyo, sacrificio, amor y ternura.

A mi abuelita por creer en mí.

A mi abuelito Ángel y a mis hermanas.

A mis Sobrinitos y a mi Papi.

Alejandra

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Familia por sus palabras de aliento, su compañía incondicional, su amor y confianza en mí.

Un agradecimiento especial A mi querido Tutor Ismael Carrillo Ph.D por su sencillez, humildad y calidad de persona permitieron una buena comunicación y que sus amplios conocimientos del tema me permitan llevar a cabo este trabajo.

A la Ingeniera Cecilia, Dr. Ignacio Angos

A mis amigos por acompañarme en este largo camino, por sus bromas y todas las experiencias que estarán siempre en mi memoria.

Alejandra

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación	1
1.2 Justificación	1
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos	3

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos.....	4
2.1.1 Quinoa.....	5
2.1.2 Proteínas	6
2.1.3 Digestión de las proteínas.....	9
2.2 Hipótesis	11
2.2.1 Rendimiento de la extracción de proteína de quinua.....	11
2.2.2 Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de quinua.....	12
2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante (<i>in vitro</i>) de las proteínas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).	12
2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis	12

2.3.1 Variable independiente	12
Aislados proteicos de quinua	12
2.3.2 Variable dependiente	12

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y métodos	13
3.1.1 Equipos	13
3.2 Desengrasado de la harina de quinua	14
3.2.1 Caracterización física de la harina de quinua	14
3.3 Preparación de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína de quinua.....	15
3.3.1 Obtención del aislado proteico de quinua.....	15
3.3.2 Rendimiento del proceso de extracción de proteína.	15
3.3.3 Obtención de hidrolizado enzimático de proteínas de quinua (Digestión gástrica) ...	16
3.3.4 Digestión duodenal de aislados proteicos de quinua.	16
3.4 Caracterización físico-química del aislado e hidrolizado de proteínas de quinua	17
3.4.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil-sulfato de Sodio (SDS PAGE) 17	
3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC).....	17
3.5 Cuantificación de proteínas.....	18
3.5.1 Método de Biuret.	18
3.5.2 Método del Ácido bicinconínico (BCA).....	18
3.6 Oxigen Radical Absorbance Capacity: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC-FL)	19
3.7 Procesamiento y análisis de los datos experimentales	19

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados	21
4.1.1 Caracterización física y proximal de la harina de quinua.....	21
4.1.1.1 Granulometría de la harina de quinua	21

4.1.1.2 Densidad aparente de la harina de quinua	22
4.1.2 Caracterización química de la harina de quinua	22
4.2 Obtención de aislados proteicos a partir de harina desengrasada de quinua.	22
4.3 Rendimiento del proceso de extracción de proteína de quinua.....	23
4.4 Análisis de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína de quinua y caracterización de la composición de péptidos que integran los aislados proteicos de quinua mediante electroforesis SDS- PAGE con agente reductor.	24
4.4.1 Caracterización de aislados proteicos de quinua mediante electroforesis SDS- PAGE.	24
4.4.2 Hidrólisis gástrica de proteína de quinua.....	28
4.4.3 Hidrólisis duodenal de aislados de proteína de quinua.....	30
4.4.4 Análisis de los aislados proteicos de quinua usando RP-HPLC.....	31
4.5 Cuantificación de proteína en los aislados.	33
4.5.1 Cuantificación de proteínas por el método de Biuret	33
4.5.2 Cuantificación de proteínas por BCA.....	34
4.6 Actividad antioxidante mediante el método ORAC.	35
4.7 Verificación de Hipótesis.....	36
4.7.1 Rendimiento de la extracción de proteína de quinua.....	36
4.7.2 Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de quinua.....	36
4.7.3 Evaluación de la actividad antioxidante (in vitro) de las proteínas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).	36

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	37
5.2 Recomendaciones	37
MATERIALES DE REFERENCIA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de hidrólisis de distintos oligopéptidos por enzimas del borde en cepillo.....	10
Figura 2. Perfil granulométrico de la harina desengrasada de quinua, se muestra la abertura del tamiz (μm) y el porcentaje de harina acumulado en cada tamiz.	21
Figura 3. Precipitados de aislados de proteína de quinua a diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0.	23
Figura 4. Aislado proteico de quinua liofilizada.	23
Figura 5. % Rendimiento promedio e intervalo de confianza LSD del proceso de aislamiento a diferentes valores de pH. Superíndices diferentes denotan diferencias significativas al 95 % de confianza. TQ2: aislamiento a pH 2; TQ3: aislamiento a pH 3; TQ6: aislamiento a pH 6; TQ5: aislamiento a pH 5; TQ4: aislamiento a pH 4,0.....	24
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2- β -mercaptoetanol de proteínas de quinua Calle 1: aislado proteico de quinua a pH 4, Calle 2: estándar de pesos moleculares.	25
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol, de diluciones de proteínas de quinua Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: dilución de proteína de quinua 10 mg/mL.; Calle3: dilución de proteína de quinua 5 mg/mL.; Calle 4: dilución de proteína de quinua 2,5 mg/mL.; Calle 5: dilución de proteína de quinua 1,25 mg/mL.	26
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de proteínas de quinua aisladas a diferentes pH. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua a pH 2.0; Calle 3: aislado de quinua a pH 3.0, Calle 4: aislado de quinua a pH 4.0, Calle 5: aislado de quinua a pH 5.0, Calle 6: aislado proteico de quinua a pH 6.0.	27

Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua aisladas a diferentes pH. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua a pH 2.0; Calle 3: aislado de quinua a pH 3.0, Calle 4: aislado de quinua a pH 4.0, Calle 5: aislado de quinua a pH 5.0., Calle 6: Aislado de quinua a pH 6.0.....	28
Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua; Calle 3: hidrolizado de quinua a pH 1.2, Calle 4: hidrolizado de quinua a pH 2.0, Calle 5: hidrolizado de quinua a pH 3.2, Calle 6: hidrolizado de quinua a pH 4.5, calle 7: hidrolizado de quinua a pH 5.5, Calle 8: aislado proteico de quinua y Calle 9: estándar de pesos moleculares.....	30
Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE de aislados proteicos de quinua e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20 (172 U/mg) y digestión duodenal. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua; Calle 3: hidrolizado gástrico de quinua a pH 3,2, Calle 4: hidrolizado duodenal de quinua con enzimas quimotripsina, tripsina, lipasas y colipasas a pH 3,2.	31
Figura 12. Análisis de RP-HPLC aislado de quinua a pH 4.	32
Figura 13. % de proteína promedio e intervalo de confianza LSD de aislados de proteínas de quinua a diferentes valores de pH, obtenidos mediante el método de Biuret. superíndices diferentes denotan diferencias significativas al 95 % de confianza. TQ6: aislamiento a pH 6,0; TQ4: aislamiento a pH 4,0; TQ5: aislamiento a pH 5,0: TQ2: aislamiento a pH 2,0; TQ3: aislamiento a pH 3.0.	34
Figura 14. Curva estándar de calibración de trolox para la determinación de actividad antioxidante del aislado a pH 4,0 e hidrolizado de proteínas de quinua a pH 1,2.	35
Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de obtención del hidrolizado de quinua.....	50
Figura 16. Curva estándar de pepsina para la cuantificación de proteína en aislado de quinua mediante el método Biuret.	61

Figura 17. Curva de lecturas obtenidas a 570 nm del aislado proteico de quinua a pH 4,0 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método de ORAC.	69
Figura 18. Curva de lecturas obtenidas a 570 nm del hidrolizado proteico de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método de ORAC.	70
Figura 19. Curva de calibración de BSA, para la cuantificación de proteínas de un aislado de quinua y los hidrolizados a pH 1.2, 2.0, 3.2. mediante el método BCA.....	74
Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE de la proteína aislada a pH 4,0	86
Figura 21. Geles de aislados proteicos de quinua obtenidos a pH 4,0	86
Figura 22. Desengrasado de la harina de quinua con n-hexano.....	88
Figura 23. Secado de la harina desengrasada con n-hexano.	88
Figura 24. Pesado de la harina de quinua desengrasada, para extraer proteína	88
Figura 25. Agitación de la harina junto con agua 10/100 (p/v) a pH 8.....	88
Figura 26. Centrifugación de la mezcla agua/harina.....	89
Figura 27. Separación del precipitado y el sobrenadante.....	89
Figura 28. Sobrenadante y torta	89
Figura 29. Precipitación isoeléctrica de la proteína a pH 4,0 (sobrenadante).....	90
Figura 30. Precipitado de proteína de quinua.....	90
Figura 31. Liofilización de Proteínas de quinua.	90
Figura 32. Proteína de quinua liofilizada.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos con actividad biológica derivados de diversas fuentes proteínicas	8
Tabla 2. Análisis proximal harina de quinua % por cada 100 g	22
Tabla 3. Cantidad de harina de quinua (g) retenida en cada tamiz.	47
Tabla 4. Granulometría de la harina de quinua desengrasada.....	47
Tabla 5. Diámetro promedio de la harina de quinua desengrasada.....	48
Tabla 6. Pesos (g) de aislado de quinua obtenidos a diferentes valores de pH.....	48
Tabla 7. Reactivos para preparar el gel separador, empleado en electroforesis SDS-PAGE para caracterizar aislados e hidrolizados proteicos de quinua	52
Tabla 8. Reactivos para preparar el gel concentrador empleado en electroforesis SDS-PAGE para caracterizar aislados e hidrolizados proteicos de quinua	52
Tabla 9. Reactivos para preparar buffer running para electroforesis SDS-PAGE en la caracterización de aislados e hidrolizados proteicos de quinua	52
Tabla 10. Reactivos para preparar buffer de muestra, 2-β Mercaptoetanol para la disociación de enlaces disulfuro de proteínas de quinua y sus hidrolizados.....	52
Tabla 11. Reactivos para preparar azul brillante de Coomassie G-250 para la tinción de bandas de proteínas de quinua obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE.....	53
Tabla 12. Preparación de la pepsina para la digestión gástrica.....	55
Tabla 13. Preparación de enzimas para la digestión duodenal de aislados proteicos de quinua.....	55
Tabla 14. Valores para la construcción de curva estándar de pepsina para la cuantificación de proteína mediante Biuret.....	60

Tabla 15. Preparación del trolox para la curva de calibración	65
Tabla 16. Curva de trolox para la determinación de actividad antioxidante de aislados proteicos de quinua a pH 4,0 y de hidrolizado de quinua a pH 1,2	65
Tabla 17. Placa del volumen (μL) añadido a cada pocillo de: controles, blancos y muestras (hidrolizado de quinua), para la construcción de la curva de calibración de trolox y análisis de las muestras a 570 nm.....	66
Tabla 18. Placa del volumen (μL) añadido a cada pocillo de: controles, blancos y muestras (aislado proteico de quinua), para la construcción de la curva de calibración de trolox y análisis de las muestras a 570 nm.....	66
Tabla 19. Concentración de muestra de hidrolizado de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante ORAC.....	67
Tabla 20. Absorbancias medidas a 570 nm de la muestra de hidrolizado proteico de quinua a pH 1,2 para la determinación de la actividad antioxidante	67
Tabla 21. Concentración de muestra de aislado proteico de quinua a pH 4,0 para la determinación de actividad antioxidante mediante ORAC.....	67
Tabla 22. Absorbancias medidas a 570 nm de la muestra de aislados proteicos de quinua a pH 4,0 para la determinación de la actividad antioxidante	68
Tabla 23. Datos para la construcción de la curva estándar de trolox, para la evaluación de la actividad antioxidante de aislado proteico de quinua a pH 4,0 y de hidrolizado de quinua a pH 1,2 mediante ORAC.	68
Tabla 24. Lecturas obtenidas de la lectura a 570 nm del hidrolizado de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ORAC.	69
Tabla 25. Concentraciones de BSA y muestras de hidrolizados de quinua y un aislado puro obtenido a pH 4,0 para obtener la curva de calibración y lectura a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.	72

Tabla 26. Lecturas a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.....	72
Tabla 27. Lecturas corregidas con el blanco a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.....	73
Tabla 28. Volumen de BCA de acuerdo al Kit, para la preparación de la curva de calibración de BSA	74
Tabla 29. Pesos (g) de aislados de proteína de quinua a diferentes valores de pH.....	76
Tabla 30. % de rendimiento de extracción de proteínas de quinua a diferentes pHs sobre 100 g. de harina de quinua	76
Tabla 31. ANOVA para % de Rendimiento de extracción de proteína de quinua a diferentes valores de pH.....	76
Tabla 32. Test LSD Fisher, 95 %, para % de proteína de quinua aislada	77
Tabla 33. Absorbancias obtenidas de tres hidrolizados de quinua a pH 1,2; 2,0 y 3,2 y del aislado puro obtenido a pH 4,0, para la determinación de contenido proteico mediante BCA.....	79
Tabla 34. Análisis de varianza para % proteína mediante BCA medida en hidrolizados gástricos a pH de 1,2; 2,0 y 3,2 y en el aislado puro proteico de quinua obtenido a pH 4,0.....	80
Tabla 35. Test LSD Fisher, 95 %, para el contenido proteico (%) de hidrolizados y aislado puro de quinua.	80
Tabla 36. Datos de absorbancia a longitud de onda de 540 nm para cuantificación de proteína mediante Biuret, de aislados proteicos de quinua obtenidos a diferentes pH de aislamiento.	82
Tabla 37. Análisis de varianza para % de Proteína/ml mediante el método de Biuret. ...	82

Tabla 38. Test LSD Fisher, 95 %, para el contenido proteico (%) aislado puro de quinua
obtenido a diferentes pHs.....82

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azo-bis (2 amidino-propano) dihidrocloruro

BCA: método del Ácido Bicinchonínico

BSA: Albúmina de suero bovino o por sus siglas en inglés, *BSA*

CELSS: Controlled Ecological Life Support System'

E/S: Enzima/sustrato

IgE: Inmunoglobulina E

kDa kilodalton

ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, por sus siglas en inglés *ORAC*.

RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de fase reversa por sus siglas en inglés *RP-HPLC*

RPM: Revoluciones por minuto

SDS PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil-sulfato Sódico por sus siglas en inglés *SDS PAGE*

SGF: Fluido gástrico simulado

TFA: Acido trifluoroacetico o por sus siglas en inglés *TFA*.

Trolox: Es un análogo hidrosoluble del alfatocoferol. En virtud de su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial, el Trolox es universalmente empleado como estándar en las curvas de comparación de diversos ensayos de actividad antioxidante (como ORAC, TEAC).

RESUMEN

El presente trabajo se basó en la caracterización de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación de su digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro*, a partir de harina desengrasada de quinua. Los aislados fueron obtenidos a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. Se obtuvo mayor % de rendimiento en el aislado obtenido a pH 4,0 con $6,29 \% \pm 0,03$ y un contenido proteico de $64,97 \% \pm 0,13$, el contenido proteico en los todos los aislados fue superior al 50 %. El aislado proteico de quinua se caracterizó mediante electroforesis SDS-PAGE, se observó la presencia de 7S globulinas, 11S globulinas (subunidad acida y básica) y 2S Albúmina. Posteriormente, se hidrolizaron los aislados proteicos de quinua con pepsina 1/20 (SGF) a pHs 1,2; 2,0; 3,2; 4,5 y 5,5 y se evaluaron mediante análisis de electroforesis SDS-PAGE, se determinó que las proteínas fueron totalmente hidrolizadas a los pHs 1,2; 2,0 y 3,2 después de la hidrólisis gástrica. A pH 4.5 y 5.5 las proteínas presentaron resistencia a la hidrólisis con pepsina. Mientras que después de la hidrólisis duodenal con un coctel de enzimas proteolíticas (quimotripsina, tripsina, lipasas, colipasas), las proteínas fueron hidrolizadas totalmente. Los hidrolizados de quinua a pH 1,2 no presentaron actividad antioxidante usando el método ORAC. El análisis RP-HPLC del aislado a pH 4,0 presentó picos cromatográficos entre los minutos 5 y 65, el perfil cromatográfico resultó muy complejo porque no se logró separar con definición analítica las diferentes proteínas del aislado.

Palabras clave: Biuret, BCA, ORAC, RP-HPLC, espectrofotometría.

ABSTRACT

This study was based on the characterization of quinoa protein isolates (*Chenopodium quinoa* Willd.) and evaluation of its gastric and duodenal in vitro digestibility of defatted quinoa flour. The isolates were obtained at pH 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 and 6.0. Best yield was obtained in quinoa protein isolate obtained at pH 4.0 with $6.29 \% \pm 0.03$, showing a content of protein of $64.97 \% \pm 0.13$. The content of protein in all isolates was higher than 50%. The isolate quinoa protein was characterized by SDS-PAGE. The presence of 7S globulin, 11S globulins (acidic and basic subunit) and 2S albumin were observed. Subsequently, the quinoa protein isolates were hydrolyzed with pepsin 1/20 (SGF) at pH 1.2; 2.0; 3.2; 4.5 and 5.5. These samples were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. The proteins were completely hydrolyzed at pH 1.2 and at pH 2.0 after gastric hydrolysis. At pH 4.5 and 5.5 proteins of quinoa present resistant to hydrolysis with pepsin. After duodenal hydrolysis with a cocktail of proteolytic enzymes (chymotrypsin, trypsin, lipases, colipases) proteins were completely hydrolyzed. Quinoa hydrolysates at pH 1.2 showed no antioxidant activity at the tested conditions with ORAC method. RP-HPLC analysis of quinoa protein isolated at pH 4.0 showed appearance of chromatographic peaks between 5 and 65 minutes. The chromatographic profile was very complex as separation was not performed with the analytical definition of the different proteins of isolated.

Keywords: Biuret, BCA, ORAC, RP-HPLC, spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de fomentar el uso y el consumo de quinua, va a depender en gran medida del conocimiento que se disponga sobre cómo afectan los procesos de hidrólisis a las características nutricionales y funcionales de las proteínas presentes en el pseudocereal para así orientar de mejor manera la extracción y modificación de las proteínas.

La quinua ha sido cultivada en la región andina hace 7.000 años, es valorada por sus cualidades nutricionales y su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales difíciles (**Jacobsen y Sherwood, 2002**).

Se ha despertado el interés en la quinua por el reconocimiento de su potencial agrícola y nutritivo. La quinua supera a los cereales más importantes como el arroz, por el contenido y calidad de sus proteínas (respecto al contenido de aminoácidos esenciales). El contenido proteico de la quinua fluctúa entre un 12% y 22%, la calidad de sus proteínas es considerada tan buena o mejor que la caseína, (**Ogungbenle, 2003**) debido al buen balance de los aminoácidos esenciales, sobresaliendo el triptófano, la cisteína y la metionina. Sin embargo, la mayor importancia radica en su alto contenido de lisina, un aminoácido deficitario en la mayoría de los vegetales, especialmente en el trigo (**Albarran, 1993**).

El verdadero valor de la quinua no es como un reemplazo de algunos alimentos sino como un complemento de ellos para que alcance un valor nutritivo alto (**Wahli, 1990**).

La quinua es considerada por la FAO y la OMS como un alimento único por su altísimo valor nutricional. Como un alimento libre de gluten puede consumirla la gran parte de la población, incluyendo las personas celíacas (intolerancia al gluten). La quinua mantiene sus cualidades nutritivas incluso en procesos industriales, y es capaz de sustituir notablemente a las proteínas de origen animal (**Ccbolgroup., 2006**).

Las proteínas, más allá de su actividad como macronutriente, son un producto necesario como ingrediente en la producción tecnológica de muchos alimentos tratados. A partir de esta necesidad, se desarrollaron los procesos necesarios para aislar o extraer las proteínas de sus fuentes orgánicas originales. Se obtienen así los denominados concentrados proteicos y aislados proteicos, que constituyen un purificado proteico a partir del alimento o fuente orgánica inicial (**Curare., 1995**).

A partir de aislados proteicos animales, vegetales o bacterianos, se pueden obtener hidrolizados de proteínas dependiendo del uso que vaya a tener el hidrolizado.

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos (**Lebe *et al.*, 1983**).

Por todo lo expuesto el objetivo de este proyecto es caracterizar aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su digestibilidad gastro-intestinal y duodenal (*in vitro*).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

Caracterización de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).

1.2 Justificación

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), es una planta asociada a la subfamilia *Chenopodioideae* y familia(s) *Chenopodiaceae* y/o *Amaranthaceae* (**Abugoch-James, 2009; Bhargava y Srivastava, 2013**). Es una semilla gramínea - dicotiledónea, por su alto contenido de almidón, su uso corresponde al de un cereal, entonces es considerada un pseudocereal (**Abugoch et al., 2008**).

El grano de quinua contiene entre un 12 a 23 % de proteína de calidad, fibra, minerales, antioxidantes (polifenoles) y vitaminas. (**Abugoch et al., 2008**)

Por su contenido ideal de aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales, la quinua debe considerarse como el alimento vegetal de mayor valor nutritivo (**Ando et al., 2002**)

En 1996 la quinua fue catalogada por la FAO como uno de los cultivos promisorios de la humanidad, esto se debe a que tiene grandes propiedades benéficas y múltiples usos, también es considerada como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana. Puede cultivarse a diferentes alturas, en suelos pobres y requiere poco riego (**FAO, 1996**).

En la actualidad, la quinua es procesada para obtener productos derivados, como insuflados, harinas, fideos, hojuelas, granolas, barras energéticas, etc.; sin embargo están en proceso de ser explotados otros productos más elaborados o cuya producción requiere del uso de tecnologías más avanzadas, como es el caso de la extracción de aceite de quinua, el almidón, la saponina, colorantes de las hojas y semillas, concentrados

proteicos, etc. Estos productos son considerados el potencial económico de la quinua por darle uso a características no sólo nutritivas sino fisicoquímicas, que abarcan más allá de la industria alimentaria y ofrecen productos a la industria química, cosmética y farmacéutica (**Carrillo *et al.*, 2015**)

La industria de alimentos genera una gran cantidad de residuos ricos en proteínas entre los que se encuentran las harinas desengrasadas procedentes de la extracción del aceite de las semillas o de los residuos generados durante los procesos de molienda de diversos granos. Estas harinas residuos son usadas generalmente para la alimentación del ganado, sin embargo representan uno de los reservorios de proteínas con mayor potencial para el consumo humano, (**Fredrikson *et al.*, 2001**).

El interés para el aprovechamiento de proteínas vegetales ha impulsado el desarrollo de procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la producción de concentrados y aislados proteicos (**Lqari *et al.*, 2002**). Son proteínas de fácil digestión con fermentación sin putrefacción (proteínas animales), menos acidificantes, no contienen grasas saturadas ni colesterol (**Albano, 2010**).

En los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, no sólo desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. En este sentido se viene investigando la presencia de diferentes péptidos con actividad biológica en diversos tipos de alimentos. Entre las estrategias empleadas para obtener péptidos con actividad biológica destacan la hidrólisis utilizando enzimas comerciales, los procesos de fermentación, la digestión gastrointestinal *in vivo* y la síntesis química basada en la secuencia de péptidos cuya actividad ya ha sido estudiada (**Meisel, 2001**).

Los péptidos presentan una amplia gama de actividades biológicas, relacionadas con su secuencia aminoacídica, características estructurales, propiedades de hidrofobicidad o carga y la capacidad de enlazar micro-elementos (**Iwaniak y Minkiewicz, 2007**). Según **Segura Campos *et al.* (2013)**, su presencia en hidrolizados proteicos de origen vegetal incrementaría su valor añadido, ya que una vez demostrada su actividad, resistencia a la

digestión y absorción *in vivo*, podrían usarse como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales o pueden incluirse en matrices no alimentarias y ejercer ciertos efectos beneficiosos para la salud.

Existe un consenso sobre el hecho de que debe probarse mediante estudios en humanos el efecto beneficioso que tienen para la salud el consumo de péptidos bioactivos y que en la valoración de éstos debe también tenerse en cuenta los posibles efectos adversos que podría ejercer los propios péptidos o sus sub-productos, que podrían estar contenidos inevitablemente en tales alimentos (**Hartmann *et al.*, 2007**). Estos requerimientos de seguridad incluirán la ausencia de toxicidad, citotoxicidad y alergenicidad.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Caracterizar aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas presentes en aislados e hidrolizados proteicos obtenidos a partir de harinas procedentes de quinua.
- Calcular el rendimiento del proceso de aislamiento de la proteína de quinua.
- Evaluar la digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*) de las proteínas presentes en los aislados de quinua.
- Evaluar la actividad antioxidante (*in vitro*) de las proteínas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

Cabe destacar que en el desarrollo de Sistemas Ecológicos Cerrados de Soporte de Vida (CELSS, ‘Controlled Ecological Life Support System’) de la NASA (National Aeronautics and Space Administration) con respecto al uso de plantas para soportar la vida humana en el espacio, entre los criterios de selección que estas deben cumplir se encuentran la producción de alimentos y la nutrición (**Tibbitts y Alford, 1982**); los resultados indicaron que la quinua puede ser una excelente cultivo para CELSS debido a la alta concentración de proteína, facilidad de uso, versatilidad en la preparación y el potencial para incrementar en gran medida los rendimientos en ambientes controlados (**Schlick y Bubenheim, 1993**).

Scanlin y Stone (2008), en su invención “la quinua, concentrado de proteína, la producción y la funcionalidad” obtuvieron concentrados de proteínas, así como almidón, aceite, y la fibra de grano de quinua. La proteína obtenida tuvo aproximadamente 50% en peso de proteína considerada de calidad alimentaria y / o de grado farmacéutico.

Villacres y Ruales (2001), investigaron el tema “obtención de un hidrolizado enzimático de alta función a partir del chocho (*Lupinus mutabilisSweet*)”, el aislado proteico obtenido tuvo un 99,3% de proteína, un índice de dispersibilidad de 98,2% una digestibilidad de 86,3% y pesos moleculares característicos en el intervalo de 21 a 87 kDa. El rendimiento del proceso fue de 30,7%.

El hidrolizado presento un 99,3% de proteína con una baja concentración de aminoácidos azufrados, un índice de dispersibilidad de 100% y un valor de 89% de digestibilidad. Bandas electroforéticas entre 21 y 70 kDa predominaron en la proteína hidrolizada.

Nowak et al. (2015) realizaron una revisión con el propósito de evaluar los datos de composición existentes sobre quinua que fueron compilados de acuerdo a la normativa

internacional; encontraron un número limitado de datos que cumplieron con los criterios de calidad del conjunto de datos; en general, observaron amplias variaciones en el contenido de nutrientes de la quinua por 100 g de porción comestible, por ejemplo: proteína (9,1-15,7 g), grasa total (4,0-7,6 g) y fibra dietética (8,8-14,1 g); las variaciones de los valores de nutrientes entre diferentes variedades y entre las diferentes fuentes de datos fueron considerables; los resultados mostraron el potencial nutricional de la quinua, pero también demostraron que más datos analíticos de alta calidad sobre la quinua son necesarios, especialmente para minerales y vitaminas.

Las semillas de quinua pueden presentarse como: integrales (con cáscara o cubierta), descascaradas (cáscara removida) o como descascaradas con posterior lavado (saponinas extraídas) denominada por **Stikic et al. (2012)** como “purificadas”; en cada caso, la composición química será diferente. Al respecto, estos autores en su trabajo discutieron que la proteína de quinua varía de 15, 16 a 17,41 % dependiendo del procedimiento usado para la purificación de las semillas, la remoción de la cubierta significativamente redujo el contenido de proteína de 17,41 a 15,69 %, y posteriormente, aunque no fue significativo estadísticamente, con el lavado con agua para extracción de saponinas la reducción alcanzó 15,16 %; la misma tendencia ocurrió con la fibra y cenizas, mientras que para grasa aumentó.

2.1.1 Quinua

Según (**Wilson, 1990**), la quinua es un pseudo-cereal herbáceo anual cuyo origen estaría en el altiplano o en los Andes de Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú.

Se le denomina pseudo-cereal porque no pertenece a la familia de las gramíneas como los cereales, pero presenta alto contenido de almidón y de proteínas.

El fruto de la quinua es un aquenio constituido por el perigonio que envuelve a una sola semilla, (1 fruto = 1 semilla), la semilla es el fruto maduro sin el perigonio y presenta 3 partes definidas: episperma, embrión y perisperma (**Padrón Pereira et al., 2014**). El episperma está constituido por 4 capas, una externa de superficie rugosa, quebradiza, la

cual se desprende fácilmente al frotarla, en ella se ubica la saponina la cual aporta el sabor amargo al grano y cuya adherencia a la semilla es variable con los genotipos. La segunda capa es muy delgada y lisa, la tercera capa es de coloración amarillenta, delgada y opaca y la cuarta capa, translúcida está constituida por un solo estrato de células, esta última unida a un perisperma compacto con ausencia de espacios de aire; el embrión, formado por 2 cotiledones y la radícula, constituye \approx el 30 % del volumen total de la semilla, se encuentra la mayor cantidad de proteína y envuelve al perisperma (constituido por almidón) como un anillo **Prego *et al.* (1998), Bhargava y Srivastava (2013) Padrón Pereira *et al.* (2014) y Jiménez de Erramouspe *et al.* (2010).**

Las saponinas son consideradas antinutrientes porque ejercen un efecto negativo sobre el organismo humano. Pero en el grano de quinua tienen una función protectora (**Ranhotra *et al.*, 1993).**

2.1.2 Proteínas

El contenido de proteína media reportado en la literatura para quinua está entre 12-23%, la cual es de alta calidad muy parecida a la del huevo y la leche, (**Abugoch *et al.*, 2008).** En comparación con los granos de cereales, el contenido de proteína total de quinua 16,3% en base seca, es mayor que la de la cebada (11%), arroz (7,5%), o el maíz (13,4%), y es comparable a la de trigo (15,4%) (**Abugoch *et al.*, 2008; Koziol, 1993).**

Las albúminas y globulinas son las principales proteínas de almacenamiento en la quinua (**Brinegar y Goundan, 1993.; Brinegar *et al.*, 1996).**

Las proteínas de quinua se han caracterizado mediante electroforesis por diferentes autores (**Brinegar y Goundan, 1993.; Brinegar *et al.*, 1996; Fairbanks *et al.*, 1989).**

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, las proteínas después de ciertos procesos químicos o térmicos pueden dar péptidos con actividad biológica para ayudar a reducir la actual epidemia de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial (**WHO, 1999).** Además de impactar el mercado de alimentos, donde el rubro de alimentos funcionales crece a un ritmo del 20% anual. El futuro de los alimentos funcionales es predecible, pues la preocupación por la salud conlleva al aumento de la demanda de este tipo de

productos por parte de los consumidores y al desarrollo de nuevos productos funcionales basados en efectos cuantificables sobre la salud (**Espín *et al.*, 2007**)

En este sentido, las primeras afirmaciones acerca del potencial nutracéutico de las proteínas y los péptidos derivados de ellas, se basaron en estudios *in vitro* y en limitadas intervenciones clínicas (**Möller *et al.*, 2008**). Aún es necesario evaluar aspectos fundamentales como la producción a gran escala, la estabilidad e interacción con diferentes matrices alimentarias, la estabilidad gastrointestinal, la biodisponibilidad y los posibles efectos secundarios de su consumo prolongado.

Se ha descrito que cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional, puede ser empleada para generar péptidos con actividad biológica (**Tabla 1**), potenciando así el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas, como proteínas vegetales provenientes de fuentes silvestres, residuos de pesquerías, subproductos de la extracción de aceites, etc. (**Meisel, 2001**)

Tabla 1. Péptidos con actividad biológica derivados de diversas fuentes proteínicas

Péptidos	Origen	Nombre/secuencia
Inhibidores de ECA /hipotensores	Soya	NWGPLV
	Pescado	LKP, IKP,LRP (derivado de sardina, bonito, atun, calamar)
	Carne	IKW, LKW
	Leche	Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP) Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP)
	Huevo	KVREGTTY Ovokinina (FRADHPPL) Ovokinina (2-7)(KVREGTTY)
Inmunomoduladores	Trigo	IAP Immunopeptidos
	Brocoli	YPK
	Arroz	GYPMYPLR
	Leche	Immunopeptidos (ej. as1immunocasoquinina) (TTMPLW)
Citomoduladores	Leche	α -Casomorfina (HIQKED(V)), β -casomorfina-7 (YFPFGPI)
Opioides agonistas	Trigo	Exorfinas A4, A5 (GYYPT), B4, B5 Y C (YPISL)
	Leche	α - Lactorfinas; β -Lactorfinas Casomorfinas
Opioides antagonistas	Leche	Lactoferroxina Casoxinas
Antimicrobianos	Huevo	(f 109-200)
	Leche	Lactoferricina
Antitromboticos	Leche	κ -CN(f106-116), casoplatelinas
Quelantes de metales, Anticariogenicos	Leche	Caseinofosfopeptidos
Hipocolesterolemicos	Soya	LPYPR
	Leche	IIAEK
Antioxidantes	Pescado	MY
	Leche	MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI

Fuente: (Meisel, 2001)

2.1.3 Digestión de las proteínas

La digestión de las proteínas, comienza en el estómago por la acción de la pepsina (que es una endopeptidasa). Esta enzima proteolítica se forma a partir del pepsinógeno inactivo por acción del ácido clorhídrico (HCl). Posteriormente la propia pepsina continúa con la proteólisis parcial sobre el pepsinógeno en un proceso autocatalítico. Algunos aminoácidos que se originan en esta etapa, bien como tales o al estado de péptidos pequeños, estimulan la secreción acida a través de la liberación de la gastrina **(Gil y Sanchez de Medina, 2010)**.

La digestión proteica en el intestino (duodeno y yeyuno) se inicia intraluminalmente, gracias a las enzimas liberadas por el páncreas, y continúa a nivel de las células de la mucosa intestinal, que contiene también enzimas proteolíticas. Las proteínas que van a sufrir la digestión incluyen no solamente las de origen exógeno sino también las que proceden de las diferentes secreciones digestivas y de la descamación de las células de la mucosa. La fracción endógena puede constituir hasta el 5 % del total cuando la ingesta proteica no sea importante (por ejemplo, la proteína endógena puede estar entre 60 y 95 g/ día siendo la ingesta de 75-100 g/ día) **(Hernández Rodríguez y Sastre Gallego, 1999)**.

La secreción pancreática contiene endopeptidasas (tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa) y exopeptidasa (carboxipeptidasas A y B).

La acción concertada de las enzimas proteolíticas conduce a la formación de oligopeptidos (entre 2 y 6 aminoácidos) y aminoácidos libres. La células de la mucosa intestinal sólo puede dejar pasar ciertos productos de la digestión (aminoácidos y pequeños oligopeptidos; di y tripeptidos), no siendo suficiente la actuación de las proteasas lumbales para degradar toda la proteína hasta estos compuestos, entran en acción las péptidas presentes en el borde en cepillo del enterocito (aminopeptidasas, dipeptidasas, tripeptidasas y dipeptidil aminopeptidasas) **Figura 1 (Peña *et al.*, 2004)**.

Tras la digestión combinada de las proteasas lumbales y del borde del cepillo, los productos formados entran en el enterocito y son degradados por peptidasas

citoplasmáticas hasta aminoácidos, que son los productos de degradación proteica que aparecen en sangre portal (**Peña *et al.*, 2004**).

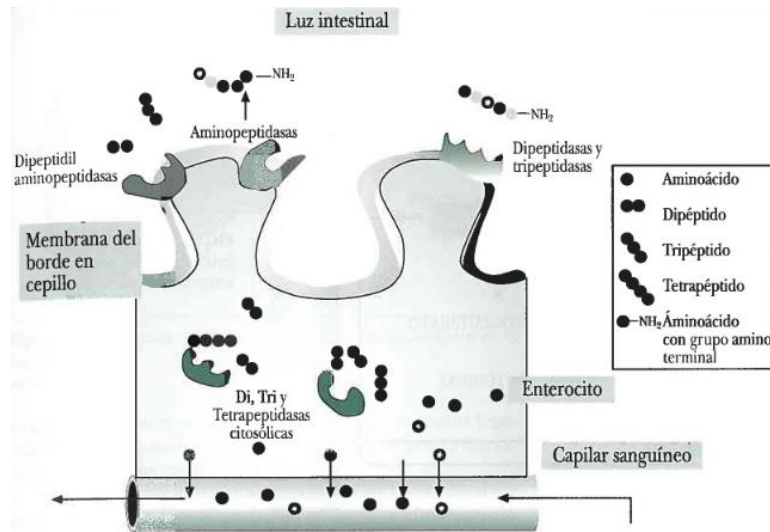


Figura 1. Mecanismos de hidrólisis de distintos oligopéptidos por enzimas del borde en cepillo.

Fuente: (**Gil y Sanchez de Medina, 2010**).

2.1.3.1 Digestión gástrica in vitro

Astwood *et al.* (1996) fueron los primeros en reportar la aplicación de un ensayo de digestión in vitro con pepsina para evaluar la alergenicidad de proteínas alimentarias. En ese estudio se comparó la digestibilidad de proteínas alergénicas frente a proteínas no alergénicas, en SGF (Fluido Gástrico Simulado consistente de 0,035 M NaCl a pH 1.2 con pepsina según la US Pharmacopoeia, 1995). Muchos de esos alérgenos fueron estables durante 60 minutos de digestión o formaron fragmentos estables, mientras que las proteínas no alergénicas fueron digeridas rápidamente, sin formar fragmentos peptídicos estables. En este estudio se concluyó que los alérgenos pueden ser más estables a la digestión que las proteínas que no eran alergénicas, proponiéndose que la digestión puede ser un parámetro eficaz para distinguir alérgenos de proteína no alergénicas.

Los ensayos de digestión in vitro con pepsina en un principio fueron desarrollados y utilizados para evaluar el valor nutricional de las proteínas como fuentes de aminoácidos viables (**Márquez y Lajolo, 1981**) y (**Nielson, 1988**).

Oshodi et al. (1999), describen las propiedades funcionales de la harina de quinua. **Ruales y Nair (1993)** estudiaron la solubilidad de la proteína de la harina de quinua en relación al calor (cocinar y autoclave) y se encontró que la solubilidad es mayor en cocido.

Auko y Monu (2003), obtuvieron péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática, y sugieren que los péptidos de cadena corta son más activos que péptidos de cadena larga. Péptidos de bajo peso molecular poseen mayor potencial de péptidos de alto peso molecular, como agente antihipertensivo o como compuestos que reducen la cantidad de radicales libres (antioxidantes). Los péptidos antioxidantes pueden obtenerse a partir de la digestión de proteínas de origen animal o vegetal, ya sea empleando enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana, procesamiento y durante la digestión gastrointestinal, (**Samaranayaka y Li-Chan, 2011**).

2.2 Hipótesis

La obtención de aislados proteicos con características funcionales conocidas, es un paso para la formulación de nuevos alimentos tecnológicamente funcionales. Estos aislados proteicos se pueden usar como ingredientes funcionales. En el caso de los aislados proteicos en general y en específico de la quinua, el conocimiento de dichas características es posible a través del estudio de la relación estructura-funcionalidad de las fracciones proteicas que la componen, la que se podría determinar por medio del estudio de los cambios estructurales de la proteína, frente a distintas condiciones de procesamiento físicas y/o químicas, como el cambio de pH, al momento de su obtención o digestión relacionando cambios estructurales con modificaciones en sus propiedades funcionales, como cambio en la solubilidad, hidrofobicidad, etc.

2.2.1 Rendimiento de la extracción de proteína de quinua

Hipótesis Nula (H_0): Los valores de pH ensayados no afectan significativamente el rendimiento de aislados proteicos de quinua y su contenido proteico.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los valores de pH ensayados afectan significativamente sobre el rendimiento de aislados proteicos de quinua y su contenido proteico.

2.2.2 Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de quinua

Hipótesis Nula (H_0): Los diferentes valores de pH ensayados no afectan significativamente sobre la digestión de los aislados proteicos de quinua.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los diferentes valores de pH ensayados afectan significativamente sobre la digestión de los aislados proteicos de quinua.

2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante (*in vitro*) de las proteínas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

Hipótesis Nula (H_0): El aislado proteico de quinua a pH 4,0 y su hidrolizado a pH 1,2 no presenta actividad antioxidante.

Hipótesis Alternativa (H_1): El aislado proteico de quinua a pH 4,0 y su hidrolizado a pH 1,2 si presenta actividad antioxidante

2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1 Variable independiente

Aislados proteicos de quinua

- Aislamiento al pH óptimo de precipitación.
- Caracterización mediante RP-HPLC de los aislados proteicos.
- Cuantificación de proteína por BIURET de la muestra con mejor rendimiento.

2.3.2 Variable dependiente

Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de quinua

- Electroforesis SDS PAGE de los hidrolizados a diferentes pHs.
- Efecto del pH sobre la digestión de las proteínas de quinua.
- Concentración de enzimas pepsina sobre la digestión de aislados proteicos de quinua.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y métodos

En el presente trabajo se utilizó harina de quinua proveniente de la empresa MasCorona (Ecuador).

- Aislado de la proteína de quinua obtenido según el acápite 3.3.1
- Hidrolizado proteico de quinua obtenido según el acápite 3.3.3
 - Ácido clorhídrico (HCl) 2N
 - Probetas de 50 ml
 - Balones de aforo de 100-1000 ml
 - Hidróxido de sodio (NaOH) 2N
 - Enzimas digestivas: quimotripsina, tripsina, colipasas, lipasas, gicodesoxicolato y taurocoato de sodio hidratado
 - Espátulas
 - Micropipetas (10-1000 μ l)
 - Tubos eppendorf de 1,5 y 2 ml
 - Papel parafilm
 - Papel absorbente
 - Pasetas plásticas.
 - Vasos de precipitación.

3.1.1 Equipos

- Centrifuga Eppendorf
- Balanza Mettler Toledo
- Congeladora Panasonic
- Placa agitadora
- pH-metro Thermo.
- Equipo de electroforesis SDS-PAGE Bio Rad Mini-PROTEAN[®] Tetra System

- Liofilizador de sobremesa VirTis Bench Top Pro

3.2 Desengrasado de la harina de quinua.

La harina de quinua fue desengrasada mediante un proceso de extracción con n-hexano en una relación de 10 gramos de harina por cada 100 mL de n-hexano. Este proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua durante 5 horas y en reposo durante 19 horas completándose todo el proceso en 24 horas de contacto de la harina con el solvente. Luego se separó la harina del hexano por filtración y se la dejó a temperatura ambiente bajo campana durante 12 horas esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de hexano. La harina se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

3.2.1 Caracterización física de la harina de quinua

3.2.1.1 Granulometría.

Se determinó el análisis granulométrico según norma **INEN 517, 1980-12** con 100 g de harina de quinua desengrasada y se utilizó una serie de tamices U.S.A Standard Testing Sieve No. 40, 60, 100, 140 y 200 que se instalaron en un tamizador eléctrico Porter Sand Shaker BICO Serial No. 59780, con un tiempo de agitación de 5 minutos. Al finalizar la prueba se determinó el porcentaje de material retenido en cada uno de los tamices.

3.2.1.2 Densidad aparente.

Se determinó la densidad aparente, según el método descrito por (**Vilche *et al.*, 2003**), al pesar una cantidad de harina de quinua y se transfirió a una probeta de volumen conocido. El cálculo de la densidad aparente se realizó con la siguiente ecuación.

$$Densidad\ aparente = \frac{Peso\ de\ la\ muestra\ (g)}{Volumen\ ocupado\ (ml)}$$

Ecuación 1

3.3 Preparación de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína de quinua.

3.3.1 Obtención del aislado proteico de quinua

El aislado proteico de quinua fue obtenido según el método descrito por (Martínez, 1997), con modificaciones. Se utilizó harina de quinua desengrasada, solución de NaOH 2 N, solución de HCl 2 N una balanza analítica de 0,1 mg de precisión, una plancha magnética, una probeta de 100 mL, un erlenmeyer de 500 mL, un ultracongelador, un equipo liofilizador de sobremesa VirTis Bench Top Pro. La harina desengrasada fue suspendida en agua en una concentración de 10 g de harina por cada 100 mL de agua, se llevó el pH de la suspensión a pH 8,0 con NaOH 2 N bajo una agitación intensa en un agitador magnético y se lo mantuvo durante 1 hora controlando el pH regularmente.

Transcurrido ese tiempo se centrifugó 30 minutos a 10.000 RPM a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante, se llevó a pH 4,0 con una solución HCl 2 N para precipitar proteínas, manteniéndolo durante 10 minutos bajo agitación y luego se centrifugó 20 minutos a 10.000 RPM y 4 °C.

El precipitado de proteínas y se suspendió en agua llevando el pH a 7,0 con NaOH 2 N. Luego se ultracongeló la suspensión a -86 °C y se liofilizó a -50 °C. El liofilizado se molió con mortero y se guardó herméticamente a 4 °C hasta su utilización. El contenido de proteínas fue determinado por el método de Biuret.

3.3.2 Rendimiento del proceso de extracción de proteína.

Para el cálculo del rendimiento del proceso de obtención de proteínas de quinua, la extracción se llevó a cabo a valores de pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. Se utilizó harina de quinua desengrasada, solución de NaOH 2 N, solución HCl 2 N, una balanza analítica de 0,1 mg de precisión, un agitador magnético con calefacción VWR[®], una probeta de 100 mL, un Erlenmeyer de 500 mL, un ultracongelador, un equipo medidor de pH Mettler-Toledo y un equipo liofilizador de sobremesa VirTis Bench Top Pro. La harina desengrasada fue suspendida en agua en una concentración de 10 g de harina por cada 100 mL de agua, se llevó el pH de la suspensión a pH 8,0 con NaOH 2 N bajo una agitación

intensa en un agitador magnético y se lo mantuvo durante 1 hora controlando el pH regularmente.

Transcurrido ese tiempo, se centrifugó 30 minutos a 10.000 RPM a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante, se llevó a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0 con una solución de HCl 2 N para precipitar proteínas manteniéndolo durante 10 minutos bajo agitación y luego se centrifugó 20 minutos a 10.000 RPM y 4 °C. Se separó el precipitado de proteínas y se lo suspendió en agua llevando el pH a 7,0 con NaOH 2N. Luego se ultracongeló la suspensión a -86 °C y se liofilizó a -50 °C. El liofilizado se molió con mortero y se guardó herméticamente a -20 °C hasta su utilización.

3.3.3 Obtención de hidrolizado enzimático de proteínas de quinua (Digestión gástrica)

En la **Figura 15, ANEXO B** se indica el diagrama de flujo del proceso de obtención del hidrolizado enzimático a partir del aislado de quinua, bajo el procesamiento utilizado por (**Jiménez-Saiz et al., 2011**).

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo en un thermomixer ESCO Provecell™ Shaking Micro Incubador. Para ello, 5 mg/mL de proteínas de quinua se disolvieron en fluido gástrico simulado (SGF) NaCl 0,35 M y se ajustó el pH con HCl 1 N a pH: 1,2; 2,0; 3,2; 4,5 y 5,5. Se añadió la solución de pepsina (172 U/mg) en una concentración 1/20 (E/S), se dejó actuar durante 60 minutos a 500 RPM y 37 °C.

La reacción enzimática fue paralizada con bicarbonato de sodio 1 M y calentamiento a 80 °C durante 5 minutos. El hidrolizado fue congelado y posteriormente liofilizado.

3.3.4 Digestión duodenal de aislados proteicos de quinua.

Tras la digestión gástrica con pepsina, los hidrolizados de proteínas de quinua fueron sometidos a una digestión duodenal simulando las condiciones fisiológicas humanas. Para ello, 1 mL del hidrolizado gástrico de pH 3,2 fue mezclado con un coctel de enzimas proteolíticas (quimotripsina, tripsina, lipasas, colipasas) (**Tabla 13**), en presencia de sales biliares y CaCl₂. Se ajustó el pH a 7,0 con NaCl 1 M y se incubó

durante 3 horas a 37 °C en un thermomixer a 500 RPM. La reacción fue detenida por calentamiento a 80 °C durante 10 minutos.

Las muestras fueron congeladas a -80 °C y liofilizadas hasta su posterior uso. Las bandas proteicas fueron caracterizadas mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reducidas y no reducidas, según el método descrito por (**Jiménez-Saiz et al., 2011**).

3.4 Caracterización físico-química del aislado e hidrolizado de proteínas de quinua

3.4.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil-sulfato de Sodio (SDS PAGE)

Mediante electroforesis SDS-PAGE se caracterizó el aislado proteico puro de quinua y los hidrolizados de proteínas de quinua, siguiendo la metodología descrita por (**Laemmli, 1970**). Para ello se usaron geles de poliacrilamida al 12 %, para determinar los pesos moleculares aproximados de las proteínas del aislado y de los hidrolizados. Se usó un estándar de pesos moleculares (14-198 kDa) de la marca Bio-Rad®, Hercules, CA, EE.UU.

Se agregaron 20 µL de muestra y 10 µL de estándar en los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo en el equipo Bio-Rad Modelo PowerPac™ Basic a 200 voltios durante 30 minutos,

Las bandas de polipéptidos se tiñeron de azul brillante de Coomassie G-250 (**Tabla 11**) durante 12 horas, y fue desteñido con una solución de ácido acético (5 %), agua y metanol (50 %).

Las masas moleculares relativas de proteína se determinaron mediante una comparación con marcadores de peso molecular (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y el software Quantity One del equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC).

El perfil del aislado de proteínas de quinua se analizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Reversa según el método descrito por (**Niessen et al., 2005**).

El aislado de proteína de quinua se identificó en RP-HPLC. Para ello se utilizó un sistema HP Hewlett-Packard (Palo Alto, California).

Como eluyente A se empleó; 100 % de agua MilliQ + Ácido trifluoroacético (TFA) al 0,037% (v/v) y como eluyente B; 100 % de acetonitrilo + TFA al 0,027 % (v/v).

El sistema de HPLC, se equipó con una bomba cuaternaria, un detector de longitud de onda variable a 220 nm y un inyector automático, todos de serie Agilent 1100.

El sistema de adquisición de datos fue Clarity Software TM.

Se empleó una columna en fase inversa C18 Hi-pore (250 x 4,6 nm de diámetro interno) (Bio-Rad, Richmond; USA).

El volumen de inyección fue de 50 µL, la concentración de la muestra fue de 5 mg/mL y disuelta en la fase A.

El aislado se eluyó con un gradiente lineal del 0% al 70% B en 65 minutos a un flujo de 0,8 mL/min.

3.5 Cuantificación de proteínas

3.5.1 Método de Biuret.

Para llevar a cabo la cuantificación de proteína en los aislados proteicos de quinua a diferentes valores de pH se siguió la metodología descrita por (Nielsen, 2010). Se utilizó aislado a diferentes valores de pH, una balanza analítica de 0,1 mg de precisión, NaOH 0,2 M, una plancha magnética, micropipetas de 25, 100 y 1000 µL, un erlenmeyer de 500 ml, reactivo de Biuret (ANEXO F) y un espectrofotómetro.

Se elaboró una curva estándar de pepsina (Figura 16), se pesó 8 mg de aislado proteico obtenido a pH 2, 3, 4.5, 5, 6, se añadió 75 µL de NaOH 0,2 M, 1 mL de agua se agitó durante 10 minutos mientras se agita se tomó 2 alícuotas de 250 µL y se añadió a los tubos eppendorff con 1,25 µL de reactivo de Biuret, se centrifugó 30 minutos a 13.000 RPM, se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm.

3.5.2 Método del Ácido bicinconínico (BCA)

La determinación de proteínas se realizó con ácido bicinconínico siguiendo el método descrito por Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (2004)

El ensayo BCA Protein es adecuado para medir la concentración de proteínas en el rango de 0,5-30 g de proteína (0,01-0,6 mg / ml).

Se utilizó, Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), se preparó una curva de calibración de BSA (**Figura 19, ANEXO H**) para la determinación del contenido de proteína en el aislado a pH 4 y los hidrolizados obtenidos a pH 1,2; 2,0 y 3,2.

3.6 Oxigen Radical Absorbance Capacity: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC-FL)

Todas las muestras fueron analizadas mediante el método de la capacidad de neutralización de radicales de oxígeno oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) para determinar su capacidad antioxidante siguiendo el método descrito por (**Contreras et al., 2011**).

El ensayo ORAC mide la actividad o capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar radicales piróxilos, mide la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína con el tiempo debido a la formación de peróxilo-radical por la descomposición de AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamide, dihidrocloruro). (**Bacchiocca et al., 2006**)

La reacción se realizó a 40°C en tampón fosfato 75 mM a pH 7.4. La mezcla final contiene fluoresceína a una concentración de (70 nM), 2 2,2'-Azinobis (2-amidinopropano) diclorhidrato AAPH (14 mM) y el antioxidante estándar, Trolox (0.2 a 1.6) o las muestras a diferentes concentraciones. La fluorescencia se midió durante 137 minutos con 104 ciclos, usándose un lector de microplaca FluoStar OPTIMA (BMG-Labtech, Offenburg, Germany) con filtros de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente. El equipo fue controlado por el software FluoStar versión (1.32 R2) para fluorescencia. Se usarán placas de poliestireno negras de 96 pocillos (Nunc, Denmark).

3.7 Procesamiento y análisis de los datos experimentales

La información se tabuló y analizó mediante el uso de paquetes informáticos, Excel, InfoStat y STATGRAPHICS Centurion XV.II. Los datos experimentales se presentaron

como valores de la media con las desviaciones típicas respectivas. Se comparó entre tratamientos mediante análisis de la varianza (ANOVA), empleando el test de mínimas diferencias significativas (LSD) y Tukey según el caso, con una significancia del 95 % para determinar las diferencias entre cada par de medias.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Caracterización física y proximal de la harina de quinua

4.1.1.1 Granulometría de la harina de quinua

En la **Figura 2**, se presenta el perfil granulométrico de la harina desengrasada de quinua, se determinó que el 99,60% de la harina de quinua desengrasada tiene un tamaño menor a 425 μm y el 0,4% una granulometría mayor a 425 μm . Estos datos muestran que el 99,60 % del material total pasó por el tamiz N^o. 40 y un 86,26% por el tamiz N^o. 60, lo que indica que se trata de una harina semi-gruesa, debido a que las harinas con partículas de tamaño menor a 250 μm , son consideradas harinas semi-gruesas (**Sandoval y Valencia Rodríguez, 2005**). Los datos experimentales se presentan en las Tablas (**Tabla 4 y Tabla 5**) en el ANEXO A

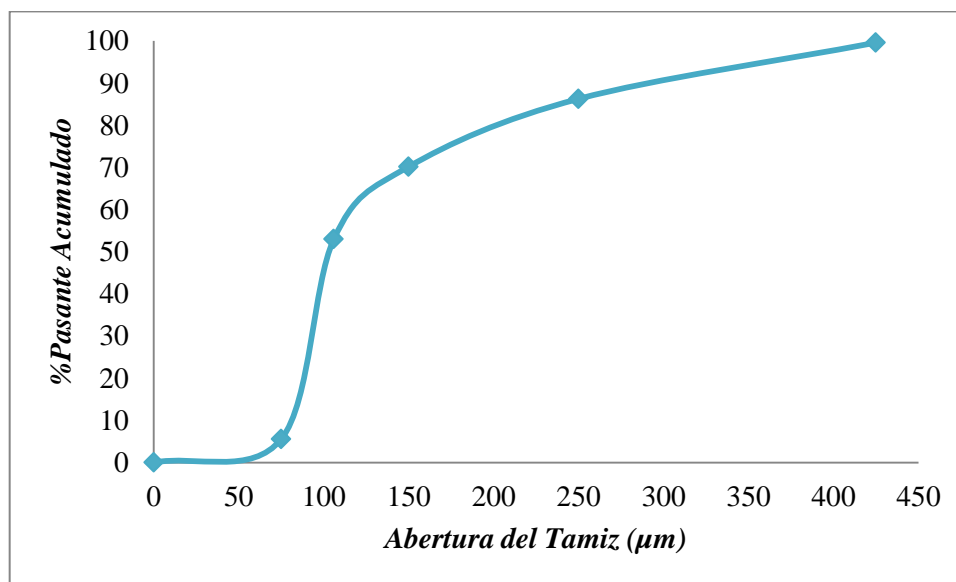


Figura 2. Perfil granulométrico de la harina desengrasada de quinua, se muestra la abertura del tamiz (μm) y el porcentaje de harina acumulada en cada tamiz.

4.1.1.2 Densidad aparente de la harina de quinua

La harina de quinua de la empresa MasCorona, pasó por un proceso de eliminación de la grasa para mejorar el grado de extracción de la proteína.

El valor de la densidad aparente de la harina de quinua fue de 0,532 g/cm³.

4.1.2 Caracterización química de la harina de quinua

En la **Tabla 2**, se detallan los resultados obtenidos en la composición proximal, se observa que los compuestos mayoritarios son la proteína con el 13,0 % y los carbohidratos con el 69,9 % y un 4,99 % de grasa

En general los valores presentados se encuentran en los rangos de una harina rica en proteína y lista para su empleo en alimentos (**Chefttel et al., 1989**).

Tabla 2. Análisis proximal harina de quinua % por cada 100 g

Componente	%
Grasa	4,99 ± 0,09
Humedad	9,05 ± 0,06
Cenizas	2,9 ± 0,03
Proteínas	13,0 ± 0,5
Fibra Cruda	1,01
Carbohidratos Totales	69,9

Valores obtenidos de dos determinaciones, LACONAL

4.2 Obtención de aislados proteicos a partir de harina desengrasada de quinua.

Harina desengrasada de quinua fue utilizada para obtener aislados proteicos mediante precipitación isoelectrica (pI). Por ello, las proteínas fueron solubilizadas a pH 8,0 y se centrifugaron durante 1 hora.

Se ajustó el pH a 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0, para favorecer la precipitación las muestras fueron refrigeradas a 4 °C durante toda la noche.

Obteniendo un precipitado amarillento a todos los pHs ensayados (**Figura 3**).



Figura 3. Precipitados de aislados de proteína de quinua a diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0).

Los aislados fueron liofilizados y pesados para calcular el porcentaje de rendimiento.



Figura 4. Aislado proteico de quinua liofilizada.

4.3 Rendimiento del proceso de extracción de proteína de quinua

Una vez obtenidos los aislados proteicos a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0 y liofilizados se procedió a calcular el % de rendimiento del proceso de extracción.

Para ello se pesaron las tres réplicas de los distintos pHs. Se calculó la desviación estándar y se representaron los valores como la media \pm SD.

Obteniendo el valor máximo de rendimiento ($6,29 \pm 0,03$ %) para el tratamiento TQ4 (Aislamiento a pH 4), mientras que el valor mínimo ($3,37 \pm 0,21$ %) se obtuvo en el tratamiento TQ2 (Aislamiento a pH 2), reportándose la existencia de diferencias significativas de los porcentajes de rendimiento entre los tratamientos (**Figura 5**).

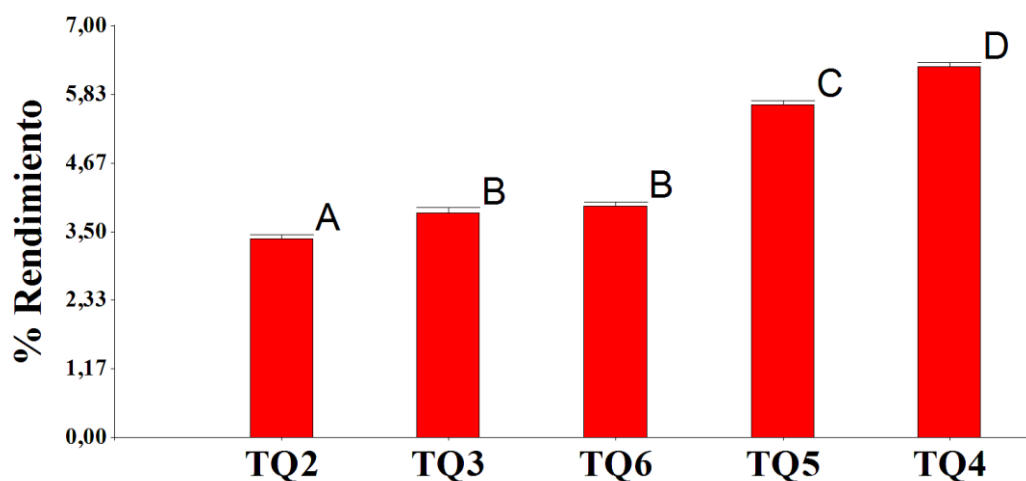


Figura 5. % Rendimiento promedio e intervalo de confianza LSD del proceso de aislamiento a diferentes valores de pH. Superíndices diferentes denotan diferencias significativas al 95 % de confianza. TQ2: aislamiento a pH 2; TQ3: aislamiento a pH 3; TQ6: aislamiento a pH 6; TQ5: aislamiento a pH 5; TQ4: aislamiento a pH 4,0.

4.4 Análisis de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína de quinua y caracterización de la composición de péptidos que integran los aislados proteicos de quinua mediante electroforesis SDS- PAGE con agente reductor.

4.4.1 Caracterización de aislados proteicos de quinua mediante electroforesis SDS-PAGE.

En la **Figura 6** se observa el gel obtenido para el aislado proteico de quinua a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación.

En condiciones no reducidas el aislado proteico obtenido con agua, presenta proteínas de alto peso molecular que fueron determinadas mediante el software Quantity one de Chemidoc™ PM (Bio-Rad).

La semilla de quinua muestra proteínas fracciones de globulinas y albúminas como proteína de almacenamiento. Las albúminas y globulinas son las fracciones de proteína más altas (44-77% del total, respectivamente), mientras que el porcentaje de prolaminas es baja (0,5 a 7,0%) (**Koziol, 1992**). Las globulinas tienen dos grupos en función de su coeficiente de sedimentación: 11S-12S y 7S-8S. Las proteínas predominantes de almacenamiento de la quinua son globulinas 11S y 7S. Recientemente, las globulinas

11S de la quinua ha sido nombradas Chenopoidinas. Esta proteína tiene dos subunidades que consisten de un polipéptido ácido (AS) (32-36 kDa) y un polipéptido básico (AB) (20-22 kDa.). Las 2S albúminas han sido descritas como una banda de bajo peso molecular < 14,4 kDa.

Las proteínas de alto peso molecular 130 kDa no se encontraron en el aislado, mientras que las proteínas con 60 kDa correspondiente a la globulina 7S según (**Abugoch et al., 2008**) se encontraron presentes. Las proteínas con peso molecular entre 33-36 kDa corresponden a 11S AS (Subunidad acida), fueron encontrados con alta expresión. Por otro lado, también se encontraron las proteínas con peso molecular 20-22 de kDa correspondiente a 11S AB (Subunidad básica). Todas las bandas de proteínas con pesos moleculares de 14,4 kDa o menores a este, corresponden a los componentes de 2S albúmina según (**Brinegar y Goundan, 1993.**) fueron encontrados en altas expresiones.

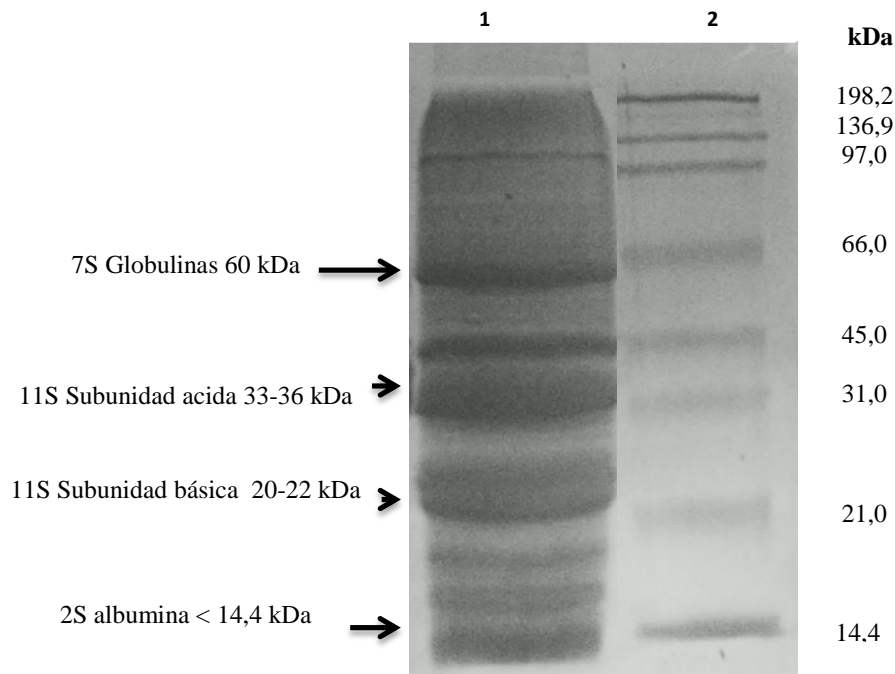


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua Calle 1: aislado proteico de quinua a pH 4, Calle 2: estándar de pesos moleculares.

En la electroforesis con SDS, la cadena polipeptídica se despliega y se rodea de moléculas de dodesil sulfato de sodio (SDS), cargándose negativamente. Dicha carga es proporcional a su longitud, y por lo tanto a su peso molecular, de modo que las

moléculas migran con movilidades relativas de acuerdo a su peso molecular. (Mathews *et al.*, 2002).

Se ensayaron distintas concentraciones de los aislados proteicos de quinua a pH 4,0 para determinar la respuesta analítica del equipo de electroforesis utilizando estos ensayos. Las concentraciones usadas fueron 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL y 1,25 mg/mL. En la **Figura 7**, se puede observar que a la concentración de 10 mg/mL de aislado proteico de quinua las bandas tienen una alta expresión. A medida que se disminuye la concentración las bandas están mejor definidas. Por esta razón en este estudio se decidió trabajar a la concentración de 5 mg/mL por su clara resolución y no haber bandas superpuestas.

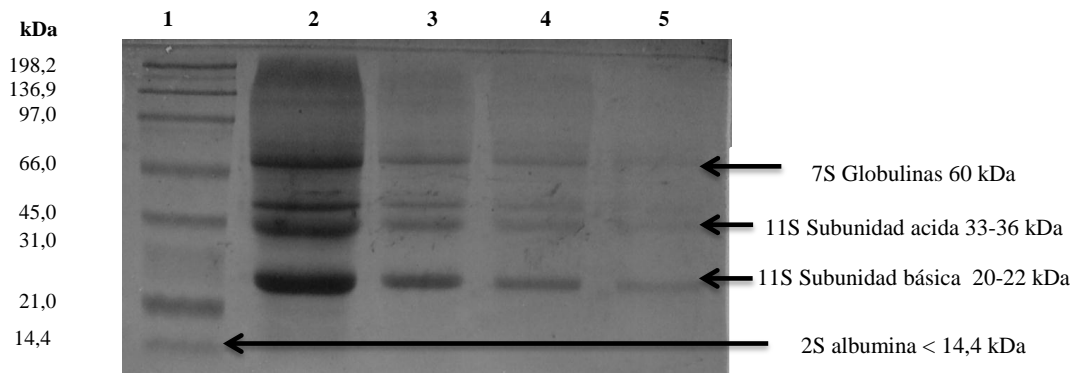


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol, de diluciones de proteínas de quinua Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: dilución de proteína de quinua 10 mg/mL.; Calle3: dilución de proteína de quinua 5 mg/mL.; Calle 4: dilución de proteína de quinua 2,5 mg/mL.; Calle 5: dilución de proteína de quinua 1,25 mg/mL.

Para investigar las subunidades de una proteína mediante SDS-PAGE, es recomendado realizar dos experimentos: uno en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro como el 2- β -mercaptoetanol y otro en ausencia, de esta manera se visualizaran entre las subunidades que se mantienen juntas mediante puentes de disulfuro y las que se mantienen juntas solo mediante fuerzas no covalentes. (Mathews *et al.*, 2002).

En la **Figura 8**, se observa el perfil proteico obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β mercaptoetanol, de aislados de quinua, obtenidos a pHs 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. En todos los pHs se observan las mismas bandas, la intensidad de las

bandas de bajo peso molecular es directamente proporcional al pH de precipitación. Para todos los pHs ensayados se observaron bandas de pesos moleculares entre 14-70 kDa.

En todos los valores de pHs ensayados, se identificó la fracción proteica correspondiente a 7S globulinas con un peso cercano a los 66 kDa, también se identificaron las fracciones correspondientes a 11S globulinas acida y 11S globulinas básicas con pesos moleculares aproximados de 36 kDa y 22 kDa respectivamente.

Mientras que las bandas de bajo peso molecular solo son más intensas a los pHs 4,0; 5,0 y 6,0, estas bandas de peso molecular < 14,4 kDa, corresponden a la fracción 2S albúminas, estos resultados están acorde a los reportados por **Brinegar et al. (1996.)**, de acuerdo a un estudio de las proteínas 2S en quinua estos polipéptidos tienen masas moleculares entre 10 y 15 kDa bajo condiciones reductoras.

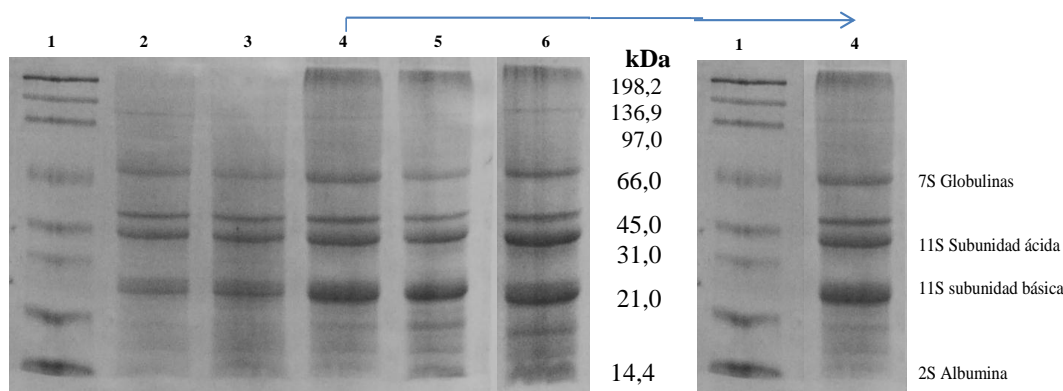


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua aisladas a diferentes pH. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua a pH 2.0; Calle 3: aislado de quinua a pH 3.0, Calle 4: aislado de quinua a pH 4.0, Calle 5: aislado de quinua a pH 5.0, Calle 6: aislado proteico de quinua a pH 6.0.

En la **Figura 9** se observa el perfil proteico de los aislados de quinua obtenidos a diferentes pHs de precipitación. En todos los pHs ensayados, se observaron bandas de pesos moleculares comprendidos entre 14 y 50 kDa.

Se observó una banda con alta intensidad a la altura de 45 kDa en todos los pHs, también se observó una banda con un peso molecular de 28 kDa y un conjunto de bandas entre 14 y 28 kDa aproximadamente.

Comparando la Figura 8 y 9, se puede evidenciar que la Figura 9 presenta menos bandas debido a que se han roto los enlaces disulfuro.

El valor de pH al que se realiza la hidrólisis afecta de manera directa sobre los péptidos obtenidos al final de la reacción, los valores menores de pH contribuyen a desnaturalizar las proteínas reduciendo los enlaces disulfuro, desplegando así algunas formas de plegamiento terciario y rompiendo la estructura cuaternaria.

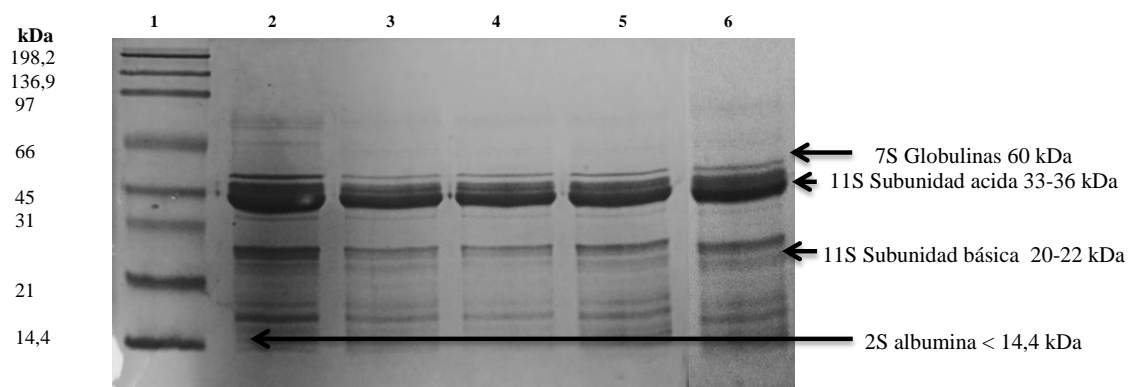


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua aisladas a diferentes pH. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua a pH 2.0; Calle 3: aislado de quinua a pH 3.0, Calle 4: aislado de quinua a pH 4.0, Calle 5: aislado de quinua a pH 5.0., Calle 6: Aislado de quinua a pH 6.0.

4.4.2 Hidrólisis gástrica de proteína de quinua.

En los hidrolizados de proteína se potencian diversas características funcionales, tales como viscosidad baja, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad, que conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales (Yin *et al.*, 2008).

El cuerpo humano ha desarrollado un complejo sistema para descomponer los alimentos y extraer los nutrientes que necesita para mantener la salud. En la ingesta los alimentos en la boca se mezclan con la saliva. Luego son sujetos a un proceso gástrico por un periodo variable en el cual el pH puede ser muy bajo, este puede cambiar por el volumen, contenido de comida o presencia o ausencia de antiácidos consumidos por el individuo y finalmente entran los alimentos al duodeno donde son neutralizados, luego pasan al yeyuno e íleon. Durante esta fase de la digestión se mezcla con enzimas

(amilasas, proteasas y lipasas) y con surfactantes (sales biliares y fosfolípidos) en el duodeno. Dependiendo del grado de hidrólisis en la fase gástrica y duodenal, las proteínas de los alimentos son degradadas a fragmentos más pequeños, para que puedan atravesar la capa de moco del epitelio. Para ello son convertidas en moléculas más pequeñas; como aminoácidos, di y tri-péptidos (**Thomas et al., 2004**).

En general, lo que le sucede a las proteínas durante el proceso de digestión ha sido estudiado en sistemas animales *in vivo*, usando medidas de digestibilidad como el balance de nitrógeno, o con sistemas *in vitro* usando proteasas (**Hochwallner et al., 2014**).

Los modelos *in vitro* tienen muchas ventajas: se usan muestras representativas y se puede utilizar cualquier tiempo, desde el inicio hasta el punto final, se pueden testar matrices alimentarias o proteínas purificadas, etc. En los modelos *in vitro* se consideran tres fases: 1) fase bucal, 2) fase gástrica y 3) fase duodenal. En la fase bucal se trituran los alimentos y se homogenizan. Las proteínas purificadas tienen un tamaño de partícula reducido y la fase bucal es omitida. Para estudios de hidrólisis de proteínas la acción de las enzimas en la boca no tiene mucha importancia, pero si en el estómago y duodeno (**Thomas et al., 2004**).

Los hidrolizados se pueden obtener mediante hidrólisis enzimática y química (básica y acida) (**Lehninger, 1984**).

La hidrólisis alcalina se utiliza normalmente para valorar el triptófano el cual es estable en estas condiciones pero inestable en el tratamiento ácido (**Lehninger, 1984**).

El pH del estómago de un adulto sano se encuentra cercano a un pH 2,0 un adulto enfermo con gastritis, úlceras etc presentan un pH muy bajo cercano al pH 1,0-1,2 por otro lado el pH del estómago de los niños se encuentra entre 3-6 (**Lebenthal et al., 1983**). La hidrólisis enzimática de la proteína de quinua, se llevó a cabo a pHs (1,2; 2,0; 3,2; 4,5 y 5,5) a 37 °C).

En la **Figura 10** se presenta el gel obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua e hidrolizados con pepsina relación E/S 1/20 (172

U/ mg de pepsina), en las calles 3, 4 y 5 se observan las digestiones llevadas a cabo a pH de 1,2; 2,0 y 3,2 respectivamente, se puede observar que existen bandas polipeptídicas de pesos moleculares de 14,4 kDa y las demás proteínas fueron totalmente digeridas con pepsina relación enzima/sustrato 1/20.

Las proteínas reducen su peso molecular e incrementa su movilidad, esto ocurre a valores de pH entre 1,2 y 3,2, a valores de pHs 4,5 y 5,5, es evidente que no hubo hidrólisis de las proteínas y se observaron en las calles 6, 7 y 8 proteínas que corresponden a 7S, 11S globulinas (Subunidad acida y básica) y 2S albuminas.

Con todo lo anterior se pudo determinar que las proteínas de quinua tienen aproximadamente un 100 % de digestibilidad gástrica, las bandas menores pueden corresponderse a los péptidos formados en la hidrólisis.

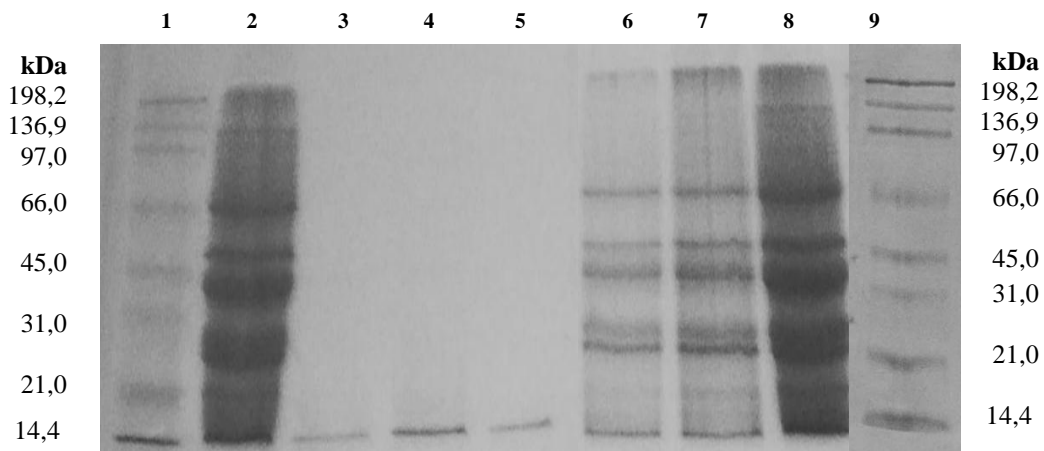


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de quinua e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua; Calle 3: hidrolizado de quinua a pH 1,2, Calle 4: hidrolizado de quinua a pH 2,0, Calle 5: hidrolizado de quinua a pH 3,2, Calle 6: hidrolizado de quinua a pH 4,5, calle 7: hidrolizado de quinua a pH 5,5, Calle 8: aislado proteico de quinua y Calle 9: estándar de pesos moleculares.

4.4.3 Hidrólisis duodenal de aislados de proteína de quinua.

Aproximadamente entre el 85-90 % de la proteína que alcanza el intestino delgado es digerida, el resto se excreta con las heces (Vasquez, 2003). Para ello las proteínas aisladas de harina desengrasada de quinua, fueron sometidas a un proceso de digestión

duodenal que simulo las condiciones fisiológicas humanas como son enzimas proteolíticas, (pepsina, quimotripsina, tripsina, colipasas y lipasas), sales biliares, pH, temperatura y relación enzima/sustrato (E/S).

Mediante electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β Mercaptoetanol se determinó la digestibilidad duodenal, para ello el aislado proteico de quinua fue hidrolizado con pepsina a pH 3,2, seguidamente fue tratado con una mezcla de enzimas.

En la **Figura 11**, se puede observar que todas las bandas fueron hidrolizadas después de la digestión duodenal. Ninguna de las proteínas presentó resistencia a la hidrólisis en las condiciones del ensayo.

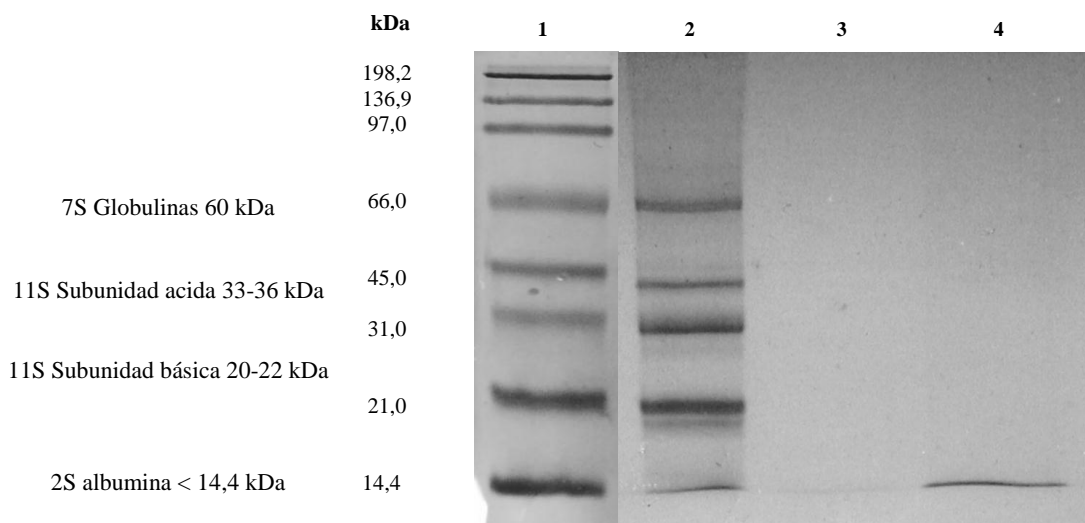


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE de aislados proteicos de quinua e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20 (172 U/mg) y digestión duodenal. Calle 1: estándar de pesos moleculares, Calle 2: aislado proteico de quinua; Calle 3: hidrolizado gástrico de quinua a pH 3,2, Calle 4: hidrolizado duodenal de quinua con enzimas quimotripsina, tripsina, lipasas y colipasas a pH 3,2.

4.4.4 Análisis de los aislados proteicos de quinua usando RP-HPLC.

El aislado proteico de quinua obtenido a pH 4 fue hidrolizado mediante RP-HPLC para conocer su perfil cromatográfico. En la **Figura 12** se puede observar la aparición de picos cromatográficos entre los minutos 5 y 65. El perfil cromatográfico es muy complejo porque no se logró separar con definición analítica las diferentes proteínas del aislado. Se sabe que las proteínas vegetales son muy complejas para ser analizadas con

esta técnica. Para obtener una buena resolución, las muestras tienen que ser fraccionadas para su posterior análisis, mediante el uso de filtros o membranas de diferentes tamaños de poro; 3.000, 5.000, 8.000 y 10.000 Da. Posteriormente se necesita un análisis de RP-HPLC y RP-HPLC acoplado a espectrometría de masas.

También, se puede observar que estas proteínas tienen una naturaleza hidrofóbica porque son eluidas con el solvente orgánico (acetonitrilo).

Los máximos de absorbancia se encuentran en las fracciones proteicas comprendidas entre los minutos 30-50

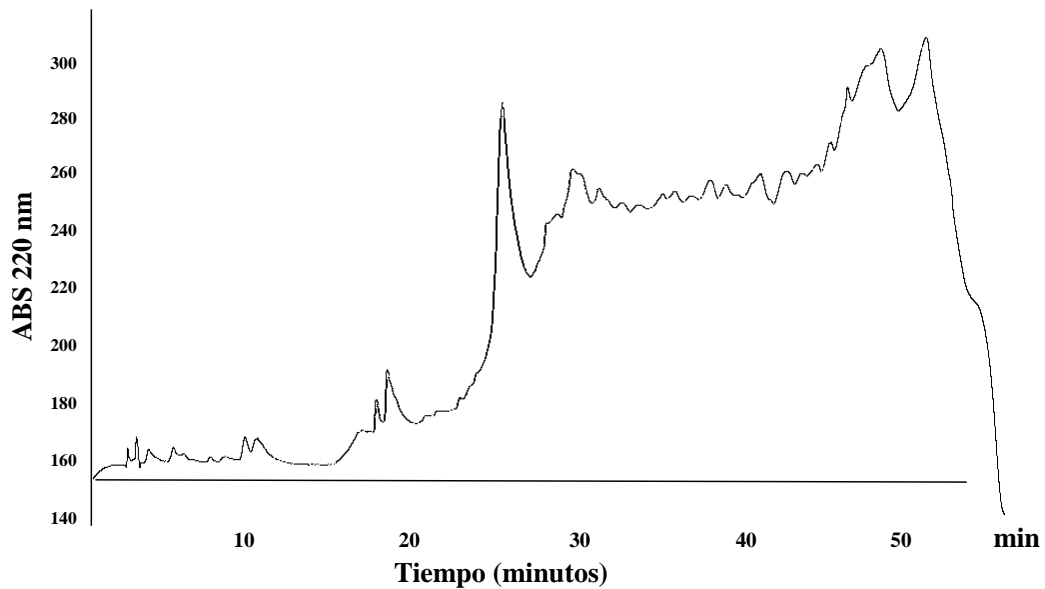


Figura 12. Análisis de RP-HPLC aislado de quinua a pH 4.

4.5 Cuantificación de proteína en los aislados.

4.5.1 Cuantificación de proteínas por el método de Biuret

El análisis de los resultados obtenidos mediante el método de Biuret, reveló que existe un $64,97\% \pm 0,13$ sobre 100% de contenido proteico en forma de péptidos en el aislado a pH 4 (**Figura 13**).

Rivera (2006), obtuvo un aislado proteico de quinua orgánica proveniente de la VI Región y lo caracterizó desde el punto de vista químico, estructural y funcional y obtuvo un contenido de proteínas totales del aislado de 77,2%. El perfil de aminoácidos coincidió con lo descrito en la literatura para la harina de quinua, por lo que la extracción de las proteínas a pH 9 no afectó el balance de aminoácidos (**Schmidt-HebbeL et al., 1992**).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (**Tabla 37**) y a nivel estadístico no se observaron diferencias significativas respecto a los aislados a pH 2-pH 3.y a los aislados a pH 4-pH 6.

En los aislados de proteína los carbohidratos solubles e insolubles son removidos, para obtener un porcentaje elevado de proteína, cercano al 90 %, como se indica en la **Tabla 36**. Además, todos los productos de proteína contienen cantidades nutricionales altas de calcio, hierro, fósforo y zinc (**Kolar et al., 1985**).

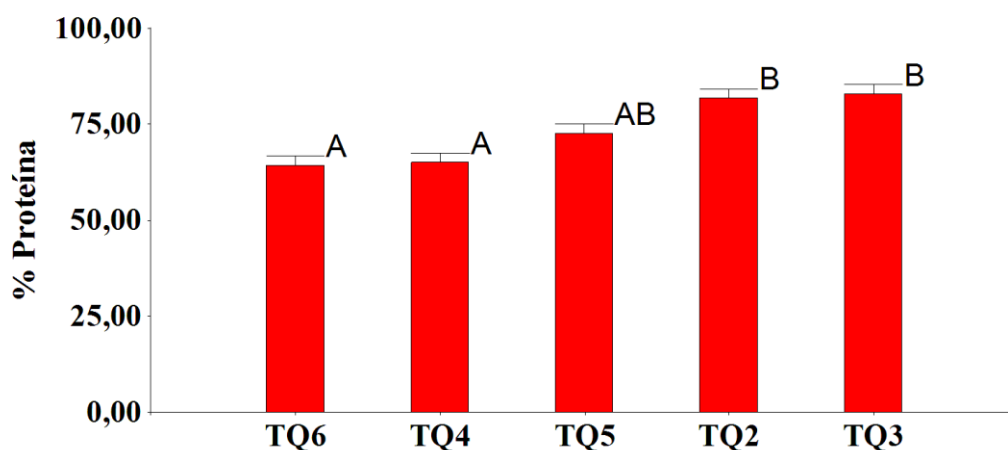


Figura 13. % de proteína promedio e intervalo de confianza LSD de aislados de proteínas de quinua a diferentes valores de pH, obtenidos mediante el método de Biuret. superíndices diferentes denotan diferencias significativas al 95 % de confianza. TQ6: aislamiento a pH 6,0; TQ4: aislamiento a pH 4,0; TQ5: aislamiento a pH 5,0; TQ2: aislamiento a pH 2,0; TQ3: aislamiento a pH 3,0.

4.5.2 Cuantificación de proteínas por BCA.

La cuantificación de proteínas de proteínas por BCA se llevó a cabo en el aislado obtenido a pH 4.

La curva de calibración de BSA (**Figura 19**), se llevó a cabo según **ANEXO E**, para ello se prepararon diluciones de BSA, en concentraciones 1000, 725, 500, 250, 125 y 25 μL y se leyeron las absorbancia a 570 nm. El aislado proteico de quinua obtenido a pH 4,0 y los hidrolizados obtenidos a pHs 1,2; 2,0 y 3,2, fueron diluidos hasta obtener las siguientes concentraciones; 1000, 500 y 250 μL , se incubaron y se leyeron las absorbancia a 570 nm.

Obteniendo la siguiente gráfica de calibración con la respectiva ecuación **Figura 19**.

Los valores de la ecuación fueron los siguientes:

$$A = 0,00080095$$

$$B = 0,05667374$$

El contenido proteico de los hidrolizados de quinua a pHs 1,2; 2,0 y 3,2 en una dilución de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue de 10,9; 9,7 y 8,7% respectivamente.

El aislado a pH 4,0 en una dilución 1.000 µg/mL obtuvo un contenido proteico de 52,4%.

4.6 Actividad antioxidante mediante el método ORAC.

Se determinó la actividad antioxidante del aislado de quinua a pH 4,0 y del hidrolizado de quinua a pH 1,2.

Mediante la curva de calibración de trolox obtenida con una concentración inicial de trolox de 0,025 µg/mL (Tabla 15, ANEXO G)

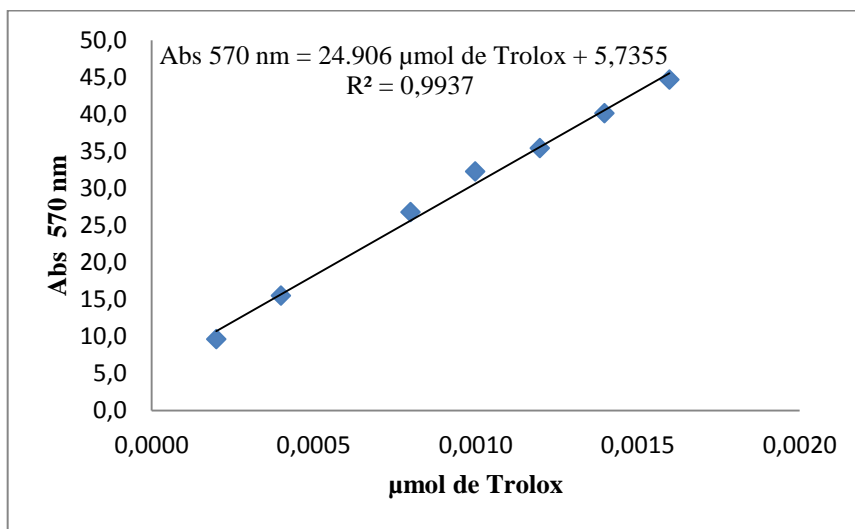


Figura 14. Curva estándar de calibración de trolox para la determinación de actividad antioxidante del aislado a pH 4,0 e hidrolizado de proteínas de quinua a pH 1,2.

Se obtuvieron las pendientes de las curvas de calibración, del aislado e hidrolizado de quinua a pH 4,0 y 1,2 respectivamente.

$$A(\text{Trolox}) = 24.906$$

$$A(\text{quinua, aislado pH 4,0}) = 19.090 \text{ (Figura 17)}$$

$$\frac{A(\text{quinua, aislado pH 4,0})}{A(\text{Trolox})} = \frac{19.090}{24.906} = 0,77$$

$$A(\text{Trolox}) = 24.906$$

$$A(\text{quinua, hidrolizado pH 1,2}) = 23.804 \text{ (Figura 18)}$$

$$\frac{A(\text{quinua, hidrolizado pH 1,2})}{A(\text{Trolox})} = \frac{23.804}{24.906} = 0,96$$

Se considera que las muestras son activas cuando el valor entre las pendientes es superior a 1, como se puede observar las muestras no presentaron actividad antioxidante con el método de ORAC.

4.7 Verificación de Hipótesis.

4.7.1 Rendimiento de la extracción de proteína de quinua.

El análisis de varianza realizado a la variable de respuesta % rendimiento de extracción de proteína mostró, con un nivel de confianza del 95 %, que el pH de precipitación isoelectrica empleado en la obtención de proteína influye significativamente sobre el rendimiento de aislado y el contenido proteico, el mejor pH de precipitación fue 4,0 (Tabla 32, ANEXO I).

4.7.2 Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de quinua.

Los valores de pHs ensayados durante la hidrólisis gástrica indica que existe mayor digestión y desdoblamiento de enlaces disulfuro a a pHs entre 1,2; 2,0 y 3,2 (Figura 10), en los que ya no se observa ninguna banda peptídica.

La digestión duodenal completa el proceso de digestión, al desdoblar completamente la cadena peptídica, con ello no se evidencia la presencia de bandas mediante SDS PAGE (Figura 11).

4.7.3 Evaluación de la actividad antioxidante (in vitro) de las proteínas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

El aislado proteico de quinua a pH 4,0 y el hidrolizado de quinua a pH 1,2, no presentaron actividad antioxidante a las condiciones ensayadas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Las proteínas de quinua, presentaron un punto isoeléctrico (pI) a pH 4,0, en este punto la solubilidad es mínima, presentaron un color amarillento.
- El aislado de proteínas de quinua obtenido a pH 4,0 obtuvo mayor % de rendimiento con un valor de $6,29\% \pm 0,03$ y un contenido proteico de $64,97\% \pm 0,13$. El contenido proteico, en todos los tratamientos ensayados, fue superior al 50%
- En las proteínas de quinua obtenidas mediante precipitación isoeléctrica, existió la presencia de 2S albuminas y 11S globulinas en todos los pHs ensayados. Mediante análisis de electroforesis SDS-PAGE, se determinó que las proteínas fueron totalmente hidrolizadas a pH 1,2; 2,0 y 3,2. En la digestión duodenal la digestión fue total a pH 3,2.
- El aislado proteico obtenido a pH 4,0 y el hidrolizado a pH 1,2 no presentaron actividad antioxidante, en las condiciones ensayadas, medido por el método ORAC.

5.2 Recomendaciones

- Para el análisis de aislados proteicos de quinua, mediante RP-HPLC se recomienda fraccionar la muestra para visualizar mejor cada una de las proteínas contenidas en el aislado.
- Se debe ensayar el método de determinación de actividad antioxidante mediante ORAC, calentando las muestras durante diferentes tiempos y filtrar la fracción proteica en diferentes membranas.

MATERIALES DE REFERENCIA

- Abugoch-James, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Food and Nutrition Research*, 58, 1-31.
- Abugoch, L., Romero, N., Tapia, C., Silva, J., y Rivera, M. (2008). Study of some physico-chemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein iso-lates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4745–4750.
- Albano, R. (2010). Proteínas vegetales y Proteínas animales.
- Albarran, C. R. (1993.). *Estudio de algunos componentes químicos, caracteres morfoanatomicos y patrones proteicos en semillas de dos ecotipos de quinua (Chenopodium quinoa Willd)*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Ando, H., Chen, Y., Tang, H., Shimizu, M., Watanabe, K., y Miysunaga, T. (2002). Food Components in Fractions of Quinoa Seed. *Food Science and Technology*, 1, 80-84.
- Astwood, J. D., Leach, J. N., y Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, 14, 1269-1273.
- Auko, R. E., y Monu, E. (2003). Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Food Science*, 68(4), 1254–1258.
- Bacchiocca, M., Biagiotti, E., y Ninfali, P. (2006). Nutritional and technological reasons for evaluating the antioxidant capacity of vegetable products. . *Italian Journal of Food Science*, 18, 209-217.
- Bhargava, A., y Srivastava, S. (2013). *Quinoa: botany, production and uses*. London, UK: CPI Group.

- Brinegar, C., y Goundan, S. (1993.). Isolation and Characterization of Chenopin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopium Quinoa*). *Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 182 – 185.
- Brinegar, C., Sine, B., y Nwokocha, L. (1996). High-cysteine 2S seed storage proteins from Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(7), 1621–1623.
- Brinegar, C., Sine, B., y Nwokocha, L. (1996.). High-cysteine 2S Seed Storage Proteins from Quinoa (*Chenopodium Quinoa*). *Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 1621–1623.
- Carrillo, W., Vilcacundo, R., y Carpio, C. (2015). Compuestos bioactivos derivados de amaranto y quinua. *Sociedad Argentina de Nutrición, SAN. Actualizacion en nutrición.*, *16*.
- Ccbolgroup. (2006). Quinua-quinua antecedentes. Retrieved 12 de Enero, 2016, from <http://ccbolgroup.com/quinuaTodo.html#ANTECEDENTES>
- Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., y Martín-Alvarez, R. I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. . *LWT- Food Science and Technology*, *44*, 9-15.
- Curare. (1995). Péptidos de Girasol: Antecedente a los Hidrolizados Proteicos. Retrieved 31 Enero, 2016, from <http://www.curare.com/Proteina%20Vegetal.htm>
- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, C. U. d. R. (2004). Métodos para la cuantificación de proteínas (pp. 7). Córdoba: Reyes, F., Galván, C.
- Espín, J. C., García Conesa, M. T., y Tomás Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, *68*(22–24), 2986-3008. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014>

- Fairbanks, D., Burgener, K., Robison, L., Andersen, W., y Ballon, E. (1989). Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. (Vol. 104, pp. 190–195.): Burncoose Nurseries.
- FAO. (1996). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. (0251-1371). Roma.
- Fredrikson, M., Biot, P., Alming, M. L., Carlsson, N. G., y Sandberg, A. S. (2001). Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1208–1212.
- Gil, A., y Sanchez de Medina, F. (2010). *Tratado de nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. (2ª Edición ed.). Madrid-España: Editorial medica Panamericana.
- Hartmann, R., Wal, J. M., Bernard, H., y Pentzien, A. K. (2007). Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. *Journals Impacting Science*, 13, 897-920.
- Hernández Rodríguez, M., y Sastre Gallego, A. (1999). *Tratado de Nutrición*. Madrid: Díaz de Santos.
- Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., y Valenta, R. (2014). Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. . *Methods*, 66, 22–33. .
- Iwaniak, A., y Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6, 5-15.
- Jacobsen, S., y Sherwood, S. (2002). Cultivo de Granos Andinos en Ecuador. Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. (pp. 90). Quito, Ecuador.: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO),.

- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R., y Molina, E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127(4), 1719-1726. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Jiménez de Erramouspe, P. L., Armada de Romano, M., y Gómez Molina, S. E. (2010). Caracterización química y estructural de semillas de quinua variedad Cica. (pp. 16-19). Oruro, Bolivia: III Congreso Mundial de la Quinoa.
- Kolar, C., Richert, S., Decker, C., Steinke, F., y Vander, R. (1985). Isolated soy protein. *Food Science and Technology; New Protein Foods.*, 5, 259.
- Kozioł, M. (1993). Quinoa: A potential new oil crop. In “New crops”. *Journal Janick Gers*, 328–336.
- Kozioł, M. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa(*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 35–68.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lebe, E., Lee, P., y Heitinger, L. (1983). Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *Journal of Pediatrics*, 102, 1-9.
- Lebenthal, E., Lee, P., y Heitinger, L. (1983). Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *Journal of Pediatrics*, 102, 1-9.
- Lehninger, A. L. (1984). *Bioquímica* (2 da ed.). España: Omega, S.A.
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., y Millán, M. (2002). Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76(3), 349-356.

- Márquez, U. M. L., y Lajolo, F. M. (1981). Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from phaseolus-vulgaris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 997-1000.
- Martínez, N. (1997). *Caracterización de Proteínas de Amaranto*, . (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de La Plata., Argentina.
- Mathews, C., Van Holde, K. E., y Ahern, K. (2002). *Bioquímica* (Vol. 3). Madrid-España: Pearson Education S.A.
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides derived from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56, 83-91.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., y Jürgen Schrezenmeir, N. R. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Nielsen, S. (2010). *Food Analysis* (Cuarta Edición ed.). Estados Unidos: Springer.
- Nielson, S. S. (1988). Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases-a review. *Cereal Chemistry*., 65, 435-442.
- Niessen, S., Mcleod, I., y Yates, J. (2005). HPLC Separation of Digested Proteins and Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis. *Cold Spring Harbor*.
- Nowak, V., Du, J., y Charrondière, U. R. (2015). Assessment of the nutritional composition of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Food Chemistry*.
- Ogungbenle, H. N. (2003). Nutritional Evaluation and Functional Properties of Quinoa (Chenopodium quinoa) flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54, 153-154.
- Oshodi, A., Ogungbenle, H., y Oladimeji, M. (1999). The Chemical composition and nutritionally valuable minerals of benniseed, pearl millet and quinoa flours. *Food Science and Nutrition*, 50, 325-331.

- Padrón Pereira, C. A., Oropeza González, R. A., y Montes Hernández, A. I. (2014). Semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willdenow): composición química y procesamiento. Aspectos relacionados con otras áreas *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 116-218.
- Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., Tapia, R., y Gómez, C. (2004). *Bioquímica* (2ª Edición ed.). México: Editorial Limusa, S. A.
- Prego, I., Maldonado, S., y Otegui, M. (1998). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 82, 481-488.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., Lorenz, K. J., y Johnson, D. L. C. C. (1993). Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal Chemistry*, 70, 303-305.
- Rivera, M. (2006). *Obtención, Caracterización Estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de quinua orgánico (Chenopodium quinoa)*. (Investigación), Univesidad De Chile, Chile.
- Ruales, J., y Nair, B. (1993). Contenido de grasa, vitaminas y minerales en las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chemistry*, 48, 131-136.
- Samaranayaka, A. G. P., y Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3, 229-254.
- Sandoval, M. A., y Valencia Rodríguez, A. Y. (2005). *Granulometría en harinas y contenido de taninos en el grano de sorgos criollos cultivados en seis departamentos de El Salvador*. (Tesis Licenciatura), Universidad de El Salvador, El Salvador. (5264)
- Scanlin, L., y Stone, M. (2008).
- Schlick, G., y Bubenheim, D. L. (1993). *Quinoa: an emerging "new" crop with potential for CELSS*. Technical Paper retrieved from

- Schmidt-HebbeL, H., Pennachiotti, I., Masson, L., y Mella, M. A. (1992). *Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos* (8 ed.). Santiago, Chile.
- Segura Campos, M., Chel Guerrero, L., y Betancur Ancona, D. (2013). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. (Investigación), Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., y Esdaile, D. J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 87-98. .
- Tibbits, T., y Alford, D. K. (1982). Controlled Ecological Life Support System. Use of higher plants. (U. o. Wisconsin, Trans.). California: NASA.
- Vasquez, E. (2003). Digestión de proteínas. Retrieved 31 ENERO, 2016, from <http://bq.unam.mx/~evazquez>
- Vilche, C., Gely, M., y Santalla, E. (2003). Physical Properties of Quinoa Seeds. . *Biosystems Engineering.*, 86, 59-65.
- Villacres, E., y Ruales, J. (2001). Acta Científica Ecuatoriana. *Acta Científica Ecuatoriana*, 1, 77-90.
- Wahli, C. (1990). *Quinoa, hacia su cultivo comercial*. . Quito-Ecuador.: Latinreco S.A. .
- WHO, W. H. O. (1999). *International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension*. . Journal of Hypertension.
- Wilson, H. D. (1990). Quinoa and Relatives (Chenopodium sect.Chenopodium subsect.Celluloid). *Springer Journals*, 44(3), 92-110.
- Yin, S., Tang, C., Cao, J., Hu, E., Wen, Q., y Yang, X. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate. *Journal Food Chemistry*, 106(3), 1004-1113.

ANEXOS

ANEXO A

**VALORES OBTENIDOS DEL ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO DE HARINA
DE QUINUA**

Tabla 3. Cantidad de harina de quinua (g) retenida en cada tamiz.

Malla ASTM No.	Peso [g] (R1)	Peso [g] (R2)	* Media	* s.d
40	0,3879	0,3913	0,3896	0,0024
60	13,0912	13,2401	13,1657	0,1053
100	15,7678	16,0311	15,8995	0,1862
140	16,8397	17,0712	16,9555	0,1637
200	46,9711	46,7563	46,8637	0,1519
Base	5,7201	5,1879	5,4540	0,3763
Total	98,7778	98,6779	98,7279	0,0706

*Valores promedio y desviación típica (s.d.) de 2 repeticiones

Tabla 4. Granulometría de la harina de quinua desengrasada.

Malla ASTM No.	Abertura Tamiz [µm]	Material retenido [g]	% Retenido	% Retenido Acumulado	% Pasaje Acumulado
40	425	0,3896	0,3946	0,3946	99,6054
60	250	13,1657	13,3353	13,7300	86,2700
100	150	15,8995	16,1044	29,8344	70,1656
140	106	16,9555	17,1740	47,0083	52,9917
200	75	46,8637	47,4675	94,4759	5,5241
Base	0	5,4540	5,5241	100,0000	0,0000

Datos promedio de 2 determinaciones.

Tabla 5. Diámetro promedio de la harina de quinua desengrasada.

Malla ASTM No.	Abertura Tamiz [µm]	Material Retenido [g]	Fracción de retenidos Δxi	Xi	Dp superior (mm)	Dp	Δxi/Dp i
40	425	99,6054	0,3167	0,6833	0,4250	0,3375	0,9382
60	250	86,2700	0,2743	0,7257	0,2500	0,2000	1,3713
100	150	70,1656	0,2231	0,7769	0,1500	0,1280	1,7427
140	106	52,9917	0,1685	0,8315	0,1060	0,0905	1,8615
200	75	5,5241	0,0176	0,9824	0,0750	-	-
Total		314,5569	1,0000		1,0060		5,9137

Diámetro promedio.

$$Dp = \frac{1}{\Delta xi / Dp i} = \frac{1}{5,9137} = 0,1690 \text{ mm}$$

Tabla 6. Pesos (g) de aislado de quinua obtenidos a diferentes valores de pH.

Ph	Pesos (g)				
	R1	R2	R3	* Media	*s.d
pH 2	1,7216	1,7787	1,5679	1,6894	0,1090
pH 3	1,8734	1,9623	1,9059	1,9139	0,0450
pH 4	3,1321	3,1652	3,1478	3,1484	0,0166
pH 4,5	3,3362	3,4657	3,4654	3,4224	0,0747
pH 5	2,8353	2,7956	2,8626	2,8312	0,0337
pH 6	1,8834	2,0012	2,0176	1,9674	0,0732

*Valores promedio y *desviación típica (s.d.) de tres repeticiones. pH 2, 3 ,4 ,4.5, 5, 6 : aislado de quinua con NaOH 2 N y HCl 2 N

ANEXO B

AISLAMIENTO DE LA PROTEÍNA DE QUINUA

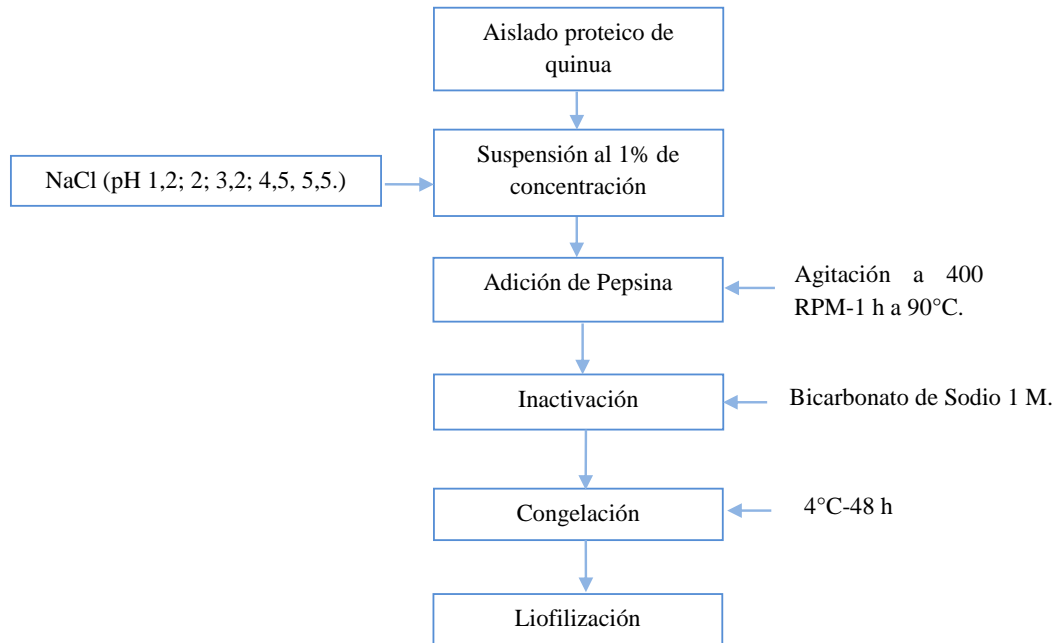


Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de obtención del hidrolizado de quinua

Fuente: (Jiménez-Saiz *et al.*, 2011).

ANEXO C
COMPOSICIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA AL 12% Y
REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

Geles de poliacrilamida al 12 %

Tabla 7. Reactivos para preparar el gel separador, empleado en electroforesis SDS-PAGE para caracterizar aislados e hidrolizados proteicos de quinua

Solución/Reactivo	Cantidad
H ₂ O	1,425 ml
Tris (1M) HCl pH 8,8	3 ml
Acilamida	3 ml
SDS 10%	75µl
Temed	9 µl
PSA	30 µl

Tabla 8. Reactivos para preparar el gel concentrador empleado en electroforesis SDS-PAGE para caracterizar aislados e hidrolizados proteicos de quinua

Solución/Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2,2 ml
Tris (1,5 M) HCl pH 6,8	0,42 ml
Acilamida	0,7 ml
SDS 10%	3,3µl
Temed	6 µl
PSA	20 L

Tabla 9. Reactivos para preparar buffer running para electroforesis SDS-PAGE en la caracterización de aislados e hidrolizados proteicos de quinua

Solución/Reactivo	Cantidad
Tris-HCl	3 gr/Lt
Glicina	15 gr/Lt
SDS	1 gr/Lt

Tabla 10. Reactivos para preparar buffer de muestra, 2-β Mercaptoetanol para la disociación de enlaces disulfuro de proteínas de quinua y sus hidrolizados.

Solución/Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2,2 ml
Tris (1,5 M) HCl pH 6,8	0,42 ml
Acilamida	0,7 ml
SDS 10%	3,3µl
Temed	6 µl
PSA	20 µl

Tabla 11. Reactivos para preparar azul brillante de Coomassie G-250 para la tinción de bandas de proteínas de quinua obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE

Solución/Reactivo	%
H ₂ O	40
azul brillante de Coomassie G-250	0,1 %
Metanol	50 %
Ácido acético	10 %

ANEXO D

PROCOLO DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

Tabla 12. Preparación de la pepsina para la digestión gástrica

Enzima (mg)	Concentración de pepsina
1 mg de pepsina	4500 unidades

Para llegar a 172 unidades de pepsina se empleó 3,82 mg de pepsina en 5 mL de 0,35 M NaCl

Tabla 13. Preparación de enzimas para la digestión duodenal de aislados proteicos de quinua

Enzima	Concentración
α Chymotripsin from bovine	[1 mM HCl 2 mM CaCl ₂]
Trypsin from bovine	[1 mM HCl: 1mg/1ml]
Colipase from bovine	[2mg/ml agua]
Lipase from porcine pancrea	[25 ml Agua (CaCl ₂ 5Mm)]
Sodium taurocholate hydrate	[50 mg/ml agua]
Glycodeoxycholate (Glyco)	[0,1 M en Agua]

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Pesar 10 gr de cada muestra
- Disolver en un ml de agua
- Centrifugar (3000 RPM por 1 min)
- Mezclar 100 μ l con 100 μ l de DMSO (Dimetil Sulfoxido)
- A la mezcla anterior se le añade 200 μ l del Buffer de Muestra (Es decir se coloca generalmente mitad-mitad)
- Calentar en baño maría a 90°C durante 5 min.
- Se agrega 20 μ l de la muestra sometida a calentamiento en cada pocillo

ADICIÓN DE LOS GELES/ELECTROFORESIS

- Primero se agrega con un gotero el gel de abajo y se deja gelificar (este es el filtrado por las proteínas)
- Se agrega el gel de arriba se deja gelificar (este sirve para encontrar las muestras)
- Se coloca el estándar en la 1^{er} y ultimo pocillo o cayo (Comparación)

- Se llena el equipo de electroforesis con el buffer de muestra
- El equipo debe marcar 200 voltios
- Una vez transcurrido el tiempo necesario se retira la muestra y se la coloca en Coomassie Brilliant Blue, azul brillante de Coomassie, durante tres horas para que se diferencien las bandas.
- Se coloca el gel con las bandas en ácido acético para una mejor visualización de las proteínas.

ANEXO E
PROTOCOLO DE BCA

CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA

Se utilizó: Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

1. Preparación de reactivo BCA

En 1 tubo de 10 ml, mezclar Reagent A y Reagent B del kit, en la siguiente proporción:

50 μ l Reagent A / 1 μ l Reagent B

Se empleó una de 96 pocillos (12*8)

2. Preparación de recta patrón de BSA (Bovine Serum Albumin)

El patrón de BSA que viene con el kit tiene una concentración de 2mg/ml. Ajustar el volumen de BSA dependiendo de la concentración del stock.

Esto se usa para generar una muestra patrón con μ g BSA en abscisas, y Abs 562 nm en ordenadas. La recta es “buena” si $0.98 < R^2 < 1$

3. Preparación de muestras a cuantificar (normalmente por triplicado, pero depende de la cantidad de muestra que tengamos y la concentración que estimemos “a ojo”: si creemos que nuestra muestra está muy concentrada, se pueden hacer diluciones de uso para medir, ej. 1:2, o 1:5, usando buffer de lisis para no cambiar la composición, que puede afectar a las medidas).

x μ l muestra + 100 μ l BCA

4. Incubar 30 minutos a 37° C, en estufa.

5. Lectura de valores de absorbancia en espectrofotómetro a 562 nm (algunos espectrofotómetros adquieren a 560 nm, esa medida también vale).

6. Idealmente, interpolamos los valores obtenidos en la recta patrón (si no se pasan por mucho, se puede extrapolar usando la fórmula; si los valores se pasan por mucho, hay que repetir la recta usando diluciones de los lisados).

7. La concentración final en μ g /ml viene dada por la media de valores para un volumen dado de muestra dividido entre los μ l de volumen.

ANEXO F
PROTOCOLO DE BIURET

PROTOCOLO DE BIURET

Reactivo de Biuret.

- Pesar 9 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
- 3g de Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- 5 g de yoduro de potasio (KI)

Se disuelven los reactivos en orden de pesaje, en 400 ml de NaOH 0,2 m.

Se completa a 1 L con Agua destilada.

PROTOCOLO DE ANALISIS.

1. Preparar la curva de calibración de pepsina.

Tabla 14. Valores para la construcción de curva estándar de pepsina para la cuantificación de proteína mediante Biuret.

	Pepsina	19,46 mg/ml	
Std PEPSINA	P. total	Conc-Std Pepsina	
g	g	mg/g (mL)	Absorbancia 540 nm
0	0	0	0,000
0,0518	0,2657	3,7944	0,139
0,0996	0,2532	7,6559	0,265
0,1430	0,2441	11,4017	0,373
0,1907	0,2422	15,3242	0,479

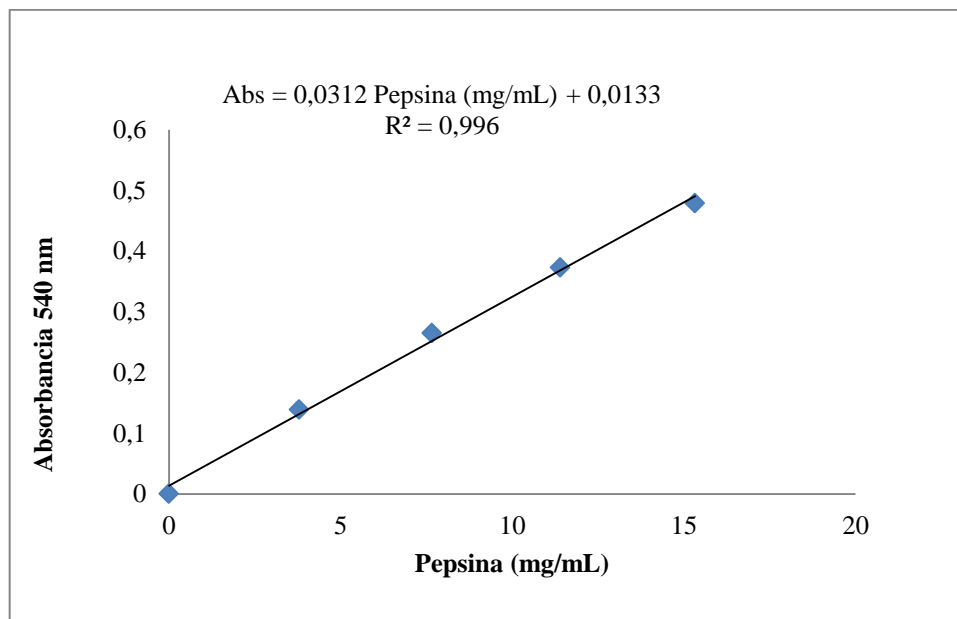


Figura 16. Curva estándar de pepsina para la cuantificación de proteína en aislado de quinua mediante el método Biuret.

Ecuación

$$y = Ax + B$$

Y= Absorbancia a 540 nm

A= 0,0327

B= 0,0133

2. En un tubo eppendorf añadir 8 mg de proteína aislada a diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0)
3. Añadir 1 mL de agua y 1,075 mL de NaOH 0,2 m
4. Agitar durante 10 min y tomar dos alícuotas de 250 μ L.
5. Se coloca esta alícuota sobre 1,25 mL de reactivo de Biuret.
6. Centrifugar por 30 minutos a 13000 RPM
7. Conservar las muestras frías.
8. Prepara un blanco (Sin proteína)
9. Medir la absorbancia a 540 nm

ANEXO G
PROTOCOLO ORAC

PROTOCOLO DE ORAC

Preparación de los reactivos mensuales:

- Phosphate buffered saline (PBS) 0,075 M (pH 7, 4)
 - Solucion A: Pesar 13,06 g de K_2HPO_4 y enrasar a 1 L con agua Milli-Q
 - Solucion B: Pesar 2,59 g de NaH_2PO_4 y enrasar a 250 mL con agua Milli-Q.

Sobre 810 mL de solución A, ir añadiendo Solución B (Aprox. 190 mL) hasta conseguir un pH de 7,4.

Conservar a 4°C.

- Fluoresceína Disodio (116,66 nM)
 - Pesar 0,01097 g de fluoresceína y enrasar a 25 mL con PBS 7,4
 - Conservar a 4°C.

Preparación de reactivos diarios:

- Solución de fluoresceína
 - F1: Tomar 100 μ L de Fluoresceína Disodio y enrasar a 10 mL con PBS 7,4
 - F2: Tomar 250 μ L de la solución anterior y enrasar a 25 mL con PBS 7,4.
- TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
 - Ti: Pesar 12,27 mg de trolox en un matraz de 50 mL. Añadir 1 mL de metanol y enrasar a 50 mL con PBS.
 - T0: Tomar 1 mL de la disolución anterior y enrasar a 10 mL con PBS 7,4.
- AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro).
 - Pesar 0,013018 g de AAPH y enrasarlo a 10 mL con PBS 7,4

Diluciones:

1. 1:1600 (v/v); 5 μ L muestras + 795 μ L de PBS (PBS específico para ORAC).
2. 1:3200 (v/v); 100 μ L de dilución + 100 μ L de PBS.

PROTOCOLO DE ANÁLISIS

- a) Calentar el fluorímetro a 37°C
- b) Hacer las diluciones, preferiblemente en frío
- c) Añadir el PBS de la curva del trolox
- d) Preparar trolox y solución de fluoresceína
- e) Cargar la placa en el siguiente orden (IMPORTANTE: Para que la plantilla de análisis salga en el orden correcto):
 - Controles: (C): 80 µL de PBS 7,4/ Pocillo
 - Blancos: (B): 20 µL de PBS 7,4/ Pocillo
 - Muestras: (M): 20 µL de muestra/ Pocillo (Por triplicad en vertical).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	C	B	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	C	B
2	C	B	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	C	B
3	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
4	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
5	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
6	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
7	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
8	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24

- f) Prepara la curva Trolox (T). Se hace lo último porque es fotosensible. Como ya se añadió el PBS, solo queda añadir el Trolox en la cantidad adecuada.

T8: 800 µL T0 + 200 µL PBS.

T7: 700 µL T0 + 300 µL PBS.

T6: 600 µL T0 + 400 µL PBS.

T5: 500 µL T0 + 500 µL PBS.

T4: 400 µL T0 + 600 µL PBS.

T3: 300 µL T0 + 700 µL PBS.

T2: 200 μ L T0 + 800 μ L PBS.

T1: 100 μ L T0 + 900 μ L PBS

Tabla 15. Preparación del trolox para la curva de calibración

	Preparación de TROLOX	Unidades
	0,01250	G
	50	Ml
	0,00025	g/mL
	10	mL
	0,00003	g/mL
	0,0250	mg/mL
[] inicial	0,0250	μ g/ μ L
Vol. Reacción	20	μ L
Peso molecular	250,29	μ g/ μ mol

Tabla 16. Curva de trolox para la determinación de actividad antioxidante de aislados proteicos de quinua a pH 4,0 y de hidrolizado de quinua a pH 1,2

Sol. Trolox	FD	[dilución] (μ g/ μ L)	μ g pocillo	μ mol pocillo
T1	10,0	0,0025	0,050	0,0002
T2	5,0	0,0050	0,100	0,0004
T3	3,3	0,0075	0,150	0,0006
T4	2,5	0,0100	0,200	0,0008
T5	2,0	0,0125	0,250	0,0010
T6	1,7	0,0150	0,300	0,0012
T7	1,4	0,0175	0,350	0,0014
T8	1,3	0,0200	0,400	0,0016

FD: se obtiene al dividir 1000/100 y sucesivamente aumentando en 100 hasta llegar a 800, Dilución (μ g/ μ L) se obtiene al dividir la concentración inicial de trolox para FD, μ g pocillo es el producto del volumen de la reacción y la dilución (μ g/ μ L) y μ mol pocillo es el cociente entre μ g pocillo y el PM trolox.

Tabla 17. Placa del volumen (μL) añadido a cada pocillo de: controles, blancos y muestras (hidrolizado de quinua), para la construcción de la curva de calibración de trolox y análisis de las muestras a 570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	98,2	7,1	16,0	21,6	27,6	32,1	38,8	40,5	44,9	49,3	98,1	6,8
B	98,3	7,7	17,7	23,8	30,5	35,8	40,1	44,7	49,7	54,4	98,0	7,2
C	86,7	73,1	48,1	35,6	28,6	26,8	93,5	75,1	58,1	41,7	32,2	27,9
D	96,6	87,5	53,2	36,5	29,3	27,3	91,2	78,1	60,0	44,0	32,3	26,4
E	90,8	78,2	52,2	35,9	28,9	27,4	92,6	78,2	57,8	44,8	32,7	25,0
F	44,0	35,1	30,0	28,5	26,9	26,4	50,5	33,3	29,7	28,6	29,0	26,0
G	40,0	34,8	30,5	28,4	27,2	26,4	50,6	34,3	30,2	28,6	29,0	25,9
H	41,2	34,1	29,6	27,6	26,2	25,7	50,5	34,2	29,4	27,6	27,5	25,2

CONTROL

BLANCO

CURVA TROLOX

MUESTRAS AISLADO PROTEICO DE QUINUA

Media blanco

7,19

Tabla 18. Placa del volumen (μL) añadido a cada pocillo de: controles, blancos y muestras (aislado proteico de quinua), para la construcción de la curva de calibración de trolox y análisis de las muestras a 570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	98,2	7,1	16,0	21,6	27,6	32,1	38,8	40,5	44,9	49,3	98,1	6,8
B	98,3	7,7	17,7	23,8	30,5	35,8	40,1	44,7	49,7	54,4	98,0	7,2
C	80,1	64,9	43,7	31,1	22,0	17,2	82,3	62,5	38,9	23,9	18,9	16,5
D	83,7	69,0	45,1	29,1	20,6	15,9	84,3	69,8	38,1	23,3	24,1	16,7
E	81,0	73,2	47,6	30,1	21,2	16,0	82,5	60,4	39,1	23,5	18,7	14,7
F	53,6	45,2	25,8	18,9	17,7	16,1	100,0	96,0	79,3	45,6	30,5	18,6
G	54,3	75,8	22,6	19,4	16,8	14,9	101,3	96,1	71,7	44,2	29,2	19,2
H	60,8	38,8	20,6	18,1	14,9	13,8	97,8	95,6	70,1	39,5	27,6	18,3

CONTROL

BLANCO

CURVA TROLOX

MUESTRAS DE HIDROLIZADO DE QUINUA

Media blanco

7,19

Tabla 19. Concentración de muestra de hidrolizado de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante ORAC

Concentración inicial: [] inicial 0,109 mg/mL.

Sol. Trolox	FD	[dilución] (µg/µL)	mg pocillo
M1,6	64,0	0,0017	0,00003
M1,5	32,0	0,0034	0,00007
M1,4	16,0	0,0068	0,00014
M1,3	8,0	0,0136	0,00027
M1,2	4,0	0,0236	0,00055
M1,1	2,0	0,0545	0,00109

Tabla 20. Absorbancias medidas a 570 nm de la muestra de hidrolizado proteico de quinua a pH 1,2 para la determinación de la actividad antioxidante

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
91,0	-0,1	8,8	14,4	20,4	24,9	31,6	33,3	37,7	42,1	90,9	-0,4
91,1	0,5	10,5	16,6	23,3	28,6	32,9	37,5	42,5	47,2	90,8	0,0
79,5	65,9	40,9	28,4	21,4	19,6	86,3	67,9	50,9	34,5	25,0	20,7
89,4	80,3	46,0	29,3	22,1	20,1	84,0	70,9	52,8	36,8	25,1	19,2
83,6	71,0	45,0	28,7	21,7	20,2	85,4	71,0	50,6	37,6	25,5	17,8
36,8	27,9	22,8	21,3	19,7	19,2	43,3	26,2	22,5	21,4	21,8	18,8
32,8	27,6	23,3	21,2	20,0	19,2	43,4	27,1	23,0	21,4	21,8	18,7
34,0	26,9	22,4	20,4	19,0	18,5	43,3	27,0	22,2	20,4	20,3	18,0

Tabla 21. Concentración de muestra de aislado proteico de quinua a pH 4,0 para la determinación de actividad antioxidante mediante ORAC.

Concentración inicial: [] inicial 0,5 mg/mL.

Sol. Trolox	FD	[dilución] (µg/µL)	mg pocillo
M1,6	64,0	0,0082	0,00016
M1,5	32,0	0,0163	0,00033
M1,4	16,0	0,0327	0,00065
M1,3	8,0	0,0654	0,00131
M1,2	4,0	0,1308	0,00262
M1,1	2,0	0,2615	0,00523

Tabla 22. Absorbancias medidas a 570 nm de la muestra de aislados proteicos de quinua a pH 4,0 para la determinación de la actividad antioxidante

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
91,0	-0,1	8,8	14,4	20,4	24,9	31,6	33,3	37,7	42,1	90,9	-0,4
91,1	0,5	10,5	16,6	23,3	28,6	32,9	37,5	42,5	47,2	90,8	0,0
72,9	57,7	36,5	23,9	14,8	10,0	75,1	55,3	31,7	16,7	11,7	9,3
76,5	61,8	37,9	21,9	13,4	8,7	77,1	62,6	30,9	16,1	17,0	9,5
73,8	66,0	40,4	22,9	14,0	8,8	75,3	53,2	31,9	16,3	11,5	7,6
46,4	38,0	18,6	11,7	10,5	8,9	92,8	88,8	72,2	38,4	23,3	11,4
47,1	68,7	15,4	12,2	9,6	7,7	94,1	88,9	64,5	37,0	22,0	12,0
53,6	31,6	13,4	10,9	7,7	6,7	90,6	88,4	62,9	32,3	20,4	11,1

Tabla 23. Datos para la construcción de la curva estándar de trolox, para la evaluación de la actividad antioxidante de aislado proteico de quinua a pH 4,0 y de hidrolizado de quinua a pH 1,2 mediante ORAC.

Curva estándar	
X= μ Mol	Y=Abs 570
0,0002	9,6
0,0004	15,5
0,0008	26,8
0,0010	32,3
0,0012	35,4
0,0014	40,1
0,0016	44,7

- g) Rápida se carga la curva de Trolox (20 μ L/ pocillo)
- h) Agregar en todos los pocillos 120 μ L de Fluoresceína.
- i) Meter la placa en el fluorímetro 10 minutos:
 - Pantalla del PC \rightarrow Semaforo \rightarrow Orac- 96 \rightarrow Ajustar Ganancia (\approx 1750) \rightarrow Run.
- j) En los 10 min de espera, se prepara el AAPH.
- k) Trascorridos los 10 min, sacar la placa (no guardar cambios) y se agrega 60 μ L AAPH/ pocillo, menos a los controles y los blancos.
- l) Meter la placa y empezar el método:
 - Semaforo \rightarrow Orac- 96 \rightarrow Ajustar Ganancia (\approx 1750) \rightarrow Plate: poner nombre y fecha \rightarrow Save test run.

El método tarda 1: 35 horas al finalizar se guardan todos los datos en Excel.

Cada placa se repite tres veces. Si los resultados son iguales $\pm 10 \%$, se toma el resultado como válido.

Tabla 24. Lecturas obtenidas de la lectura a 570 nm del hidrolizado de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ORAC.

mg de hidrolizado	Abs 570 nm
0,0002	8,78
0,0003	13,39
0,0007	16,35
0,0013	23,93
0,0026	57,05

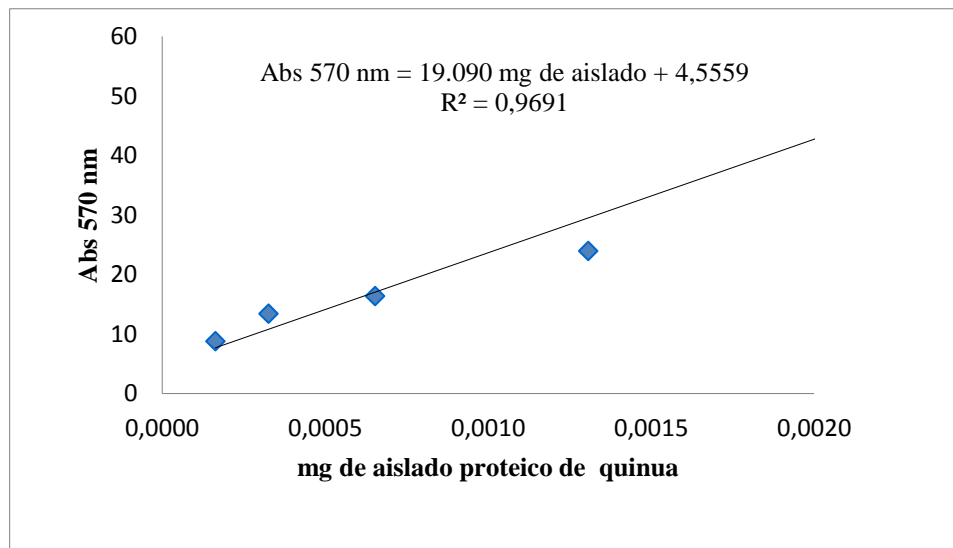


Figura 17. Curva de lecturas obtenidas a 570 nm del aislado proteico de quinua a pH 4,0 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método de ORAC.

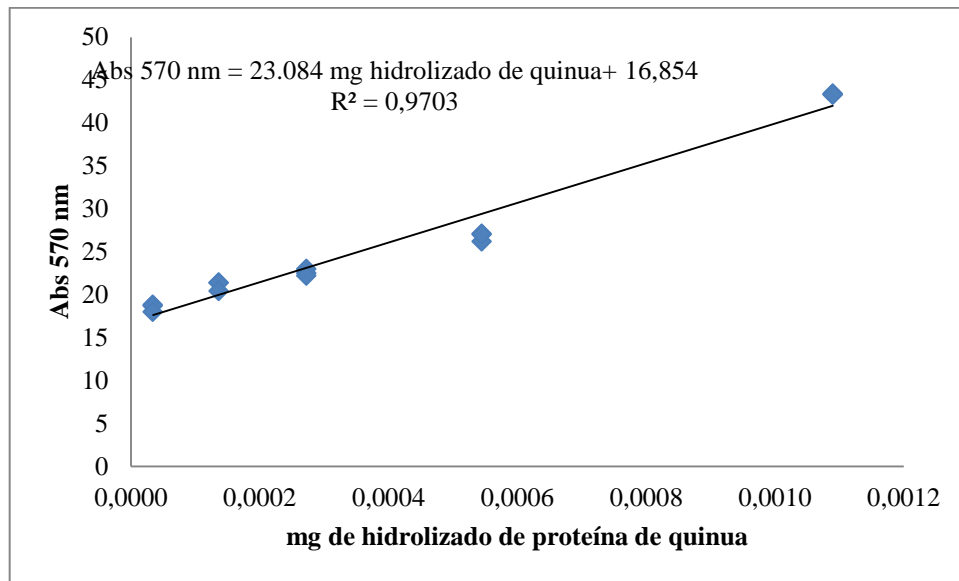


Figura 18. Curva de lecturas obtenidas a 570 nm del hidrolizado proteico de quinua a pH 1,2 para la determinación de actividad antioxidante mediante el método de ORAC.

ANEXO H

**PREPARACIÓN DE RECTA PATRON DE BSA (BOVINE SERUM ALBUMIN)
Y CUNATIFICACION DE PROTEINA MEDINATE BCA EN HIDROLIZADOS
DE QUINUA A pH 1,2; 2,0 y 3,2 Y AISLADO PROTEICO PURO DE QUINUA A
pH 4,0**

Tabla 25. Concentraciones de BSA y muestras de hidrolizados de quinua y un aislado puro obtenido a pH 4,0 para obtener la curva de calibración y lectura a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.

		BSA		-----		A. Q 4,0		H-Q 1,20		H-Q 2,0		H-Q 3,2	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PLANTILLA	A	1000 µg/mL				1000 µg/mL		1000 µg/mL		1000 µg/mL		1000 µg/mL	
	B	750 µg/mL				500 µg/mL		500 µg/mL		500 µg/mL		500 µg/mL	
	C	500 µg/mL				250 µg/mL		250 µg/mL		250 µg/mL		250 µg/mL	
	D	250 µg/mL											
	E	125 µg/mL											
	F	25 µg/mL											
	G	Blanco											
	H												

Se realizó por duplicado para tener 2 lecturas

Tabla 26. Lecturas a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DATOS	A	0,9136	0,9096			0,5717	0,5523	0,2329	0,2339	0,2249	0,2235	0,2144	0,2175
	B	0,7439	0,7733			0,3446	0,3440	0,1593	0,1675	0,1677	0,1628	0,1551	0,1597
	C	0,5844	0,5934			0,2372	0,2435	0,1406	0,1406	0,1281	0,1267	0,1244	0,1250
	D	0,3659	0,3132										
	E	0,2650	0,2673										
	F	0,1092	0,1103										
	G	0,0899	0,0891										
	H	0,0004	-0,0004										

Tabla 27. Lecturas corregidas con el blanco a 570 nm para la cuantificación de proteína mediante BCA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CORREGIDOS CON EL BLANCO	A	0,8241	0,8201			0,4822	0,4628	0,1434	0,1444	0,1354	0,134	0,1249	0,1280
	B	0,6544	0,6838			0,2551	0,2545	0,0698	0,078	0,0782	0,0733	0,0656	0,0702
	C	0,4949	0,5039			0,1477	0,154	0,0511	0,0511	0,0386	0,0372	0,0349	0,0355
	D	0,2764	0,2237										
	E	0,1755	0,1778										
	F	0,0197	0,0208										
	G	0,0004	-0,0004										
	H												

Tabla 28. Volumen de BCA de acuerdo al Kit, para la preparación de la curva de calibración de BSA

[BSA] ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 570 nm		Media	CV
1000	0,8241	0,8201	0,8221	0,3
750	0,6544	0,6838	0,6691	3,1
500	0,4949	0,5039	0,4994	1,3
250	0,2764	0,2237	0,25005	14,9
125	0,1755	0,1778	0,17665	0,9
25	0,0197	0,0208	0,02025	3,8

Valores como medias \pm SD de dos determinaciones.

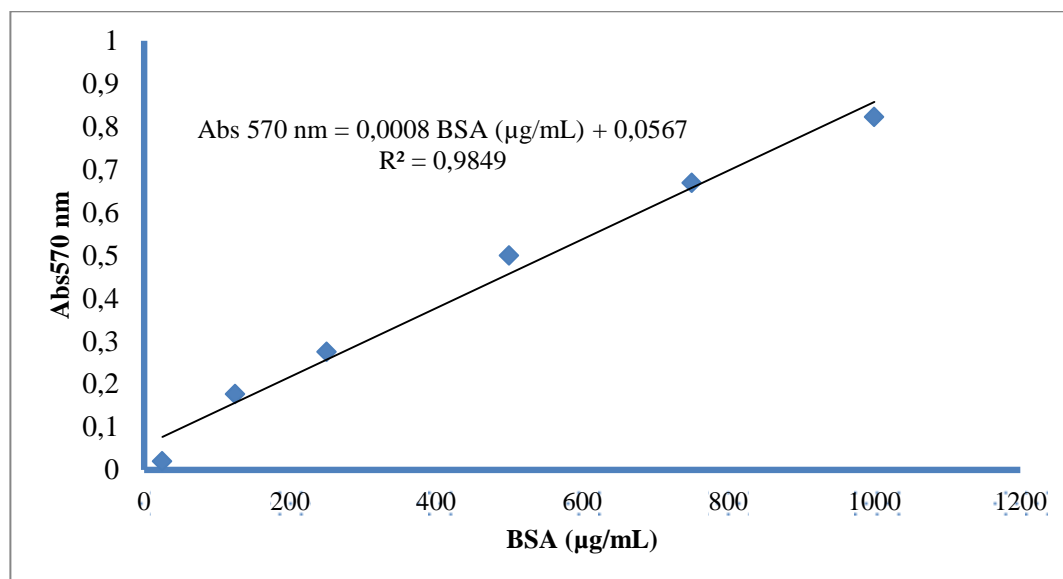


Figura 19. Curva de calibración de BSA, para la cuantificación de proteínas de un aislado de quinua y los hidrolizados a pH 1.2, 2.0, 3.2. mediante el método BCA.

ANEXO I

**RESUMEN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA % DE RENDIMIENTO DE
EXTRACCIÓN**

Tabla 29. Pesos (g) de aislados de proteína de quinua a diferentes valores de pH.

Tratamientos	Peso (g) del Aislado				
	R1	R2	R3	*Media	* S.D.
TQ2	1,7216	1,7787	1,5679	1,6894	0,1090
TQ3	1,8734	1,9623	1,9059	1,9139	0,0450
TQ4	3,1321	3,1652	3,1478	3,1484	0,0166
TQ5	2,8353	2,7956	2,8626	2,8312	0,0337
TQ6	1,8834	2,0012	2,0176	1,9674	0,0732

*Valores promedio y *desviación típica (S.D.) de 3 repeticiones. TQ2: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 2; TQ3 Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 3; TQ4: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 4; TQ5: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 5; TQ6: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 6.

Tabla 30. % de rendimiento de extracción de proteínas de quinua a diferentes pHs sobre 100 g. de harina de quinua

Tratamientos	% de Rendimiento				
	R1	R2	R3	*Media	* S.D.
TQ2	3,4432	3,5574	3,1358	3,3788	0,2181
TQ3	3,7468	3,9246	3,8118	3,8277	0,0900
TQ4	6,2642	6,3304	6,2956	6,2967	0,0331
TQ5	5,6706	5,5912	5,7252	5,6623	0,0674
TQ6	3,7668	4,0024	4,0352	3,9348	0,1464

*Valores promedio y *desviación típica (S.D.) de 3 repeticiones. TQ2: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 2; TQ3 Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 3; TQ4: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 4; TQ5: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 5; TQ6: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 6.

Tabla 31. ANOVA para % de Rendimiento de extracción de proteína de quinua a diferentes valores de pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ph	19,601	4	4,90026	290,01	0,0000
B:Réplicas	0,0280933	2	0,0140467	0,83	0,4699
RESIDUOS	0,135173	8	0,0168967		
TOTAL (CORREGIDO)	19,7643	14			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 32. Test LSD Fisher, 95 %, para % de proteína de quinua aislada

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TQ2	3	3,38	0,0750481	A
TQ3	3	3,82667	0,0750481	B
TQ6	3	3,93667	0,0750481	B
TQ5	3	5,66333	0,0750481	C
TQ4	3	6,29667	0,0750481	D

TQ2: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 2; TQ3 Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 3; TQ4: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 4; TQ5: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 5; TQ6: Solubilización a pH 8 y aislamiento a pH 6.

ANEXO J

RESUMEN ANOVA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA POR BCA

Tabla 33. Absorbancias obtenidas de tres hidrolizados de quinua a pH 1,2; 2,0 y 3,2 y del aislado puro obtenido a pH 4,0, para la determinación de contenido proteico mediante BCA.

pH	Conc. (µg/mL)	Abs 570 nm	R1	R2	R1	R2	Media	*S.D	CV
			[BSA] (µg/mL)	[BSA] (µg/mL)	% Proteína	% Proteína			
H.Q 1,2	1000	0,1434 0,1444	108,2797	109,5283	10,8280	10,9528	10,8904	0,0883	0,8107
	500	0,0698 0,0780	16,3884	26,6263	3,2777	5,3253	4,3015	1,4479	33,6595
	250	0,0511 0,0511	-6,9589	-6,9589	-2,7836	-2,7836	-2,7836	0,0000	0,0000
H.Q 2,0	1000	0,1354 0,1340	98,2916	96,5436	9,8292	9,6544	9,7418	0,1236	1,2687
	500	0,0782 0,0733	26,8760	20,7583	5,3752	4,1517	4,7634	0,8652	18,1630
	250	0,0386 0,0372	-22,5655	-24,3134	-9,0262	-9,7254	-9,3758	0,4944	-5,2731
H.Q 3,2	1000	0,1249 0,1280	85,1821	89,0525	8,5182	8,9052	8,7117	0,2737	3,1415
	500	0,0656 0,0702	11,1446	16,8878	2,2289	3,3776	2,8032	0,8122	28,9740
	250	0,0349 0,0355	-27,1850	-26,4359	-10,8740	-10,5744	-10,7242	0,2119	-1,9757
A.Q 4,0	1000	0,4822 0,4628	531,2794	507,0581	53,1279	50,7058	51,9169	1,7127	3,2989
	500	0,2551 0,2545	247,7398	246,9907	49,5480	49,3981	49,4730	0,1059	0,2141
	250	0,1477 0,1540	113,6484	121,5141	45,4594	48,6056	47,0325	2,2248	4,7303

Tabla 34. Análisis de varianza para % proteína mediante BCA medida en hidrolizados gástricos a pH de 1,2; 2,0 y 3,2 y en el aislado puro proteico de quinua obtenido a pH 4,0.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	10172,4	3	3390,81	352,88	0,0000
B:Conc	840,303	2	420,152	43,73	0,0000
RESIDUOS	172,96	18	9,60889		
TOTAL (CORREGIDO)	11185,7	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 35. Test LSD Fisher, 95 %, para el contenido proteico (%) de hidrolizados y aislado puro de quinua.

pH	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
3,2	6	0,263583	A
2	6	1,70982	AB
1,2	6	4,1361	B
4	6	49,4741	C

3,2: Hidrolizado de aislado de quinua obtenido a pH 3,2 con relación pepsina enzima/sustrato 1/20; 2: Hidrolizado de aislado de quinua obtenido a pH 2 con relación pepsina enzima/sustrato 1/20; 1,2: Hidrolizado de aislado de quinua obtenido a pH 1,2 con relación pepsina enzima/sustrato 1/20; 4: Aislado puro de quinua obtenido a pH 4,0.

ANEXO K

**RESUMEN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA % DE PROTEÍNA
MEDIANTE BIURET**

Tabla 36. Datos de absorbancia a longitud de onda de 540 nm para cuantificación de proteína mediante Biuret, de aislados proteicos de quinua obtenidos a diferentes pH de aislamiento.

% Proteína/ml						
pH	ABS1	ABS2	R1	R2	*Media	* s.d.
2	0,2160	0,1920	86,8616	76,7222	81,7919	7,1696
3	0,2035	0,2140	82,6932	83,0057	82,8495	0,2210
4	0,1715	0,1710	65,0663	64,8797	64,9730	0,1319
5	0,1870	0,1865	74,7518	70,3731	72,5625	3,0962
6	0,1645	0,1595	65,3498	63,1124	64,2311	1,5821

Tabla 37. Análisis de varianza para % de Proteína/ml mediante el método de Biuret.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ph	613,428	4	153,357	9,85	0,0239
B:Réplicas	1,28865	1	1,28865	0,08	0,7879
RESIDUOS	62,2708	4	15,5677		
TOTAL (CORREGIDO)	694,42	9			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 38. Test LSD Fisher, 95 %, para el contenido proteico (%) aislado puro de quinua obtenido a diferentes pHs

Tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TQ6	2	64,2311	2,7895	a
TQ4	2	64,5717	3,1192	a
TQ5	2	72,5625	2,7899	ab
TQ2	2	81,7919	2,7899	b
TQ3	2	82,8495	2,7899	b

TQ6: aislamiento a pH 6,0; TQ4: aislamiento a pH 4,0; TQ5: aislamiento a pH 5,0; TQ2: aislamiento a pH 2,0; TQ3: aislamiento a pH 3,0.

ANEXO L

RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE QUINUA




UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS



Dir: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Huachi, Ambato Ecuador Telefonos: 2400987 Correo: laconal@hotmail.com

"Laboratorio de ensayo acreditado por el SAE con acreditación N°: OAE LE C 10-008"

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No:15-298						R01-5.10 06
Solicitud N°: 15-298						Pág.:1 de 1
Fecha recepción: 29 octubre 2015			Fecha de ejecución de ensayos: 29 oct -05 nov 2015			
Información del cliente:						
Empresa: n/a			C.I./RUC: 0503858888			
Representante: Mayra Alejandra Toapanta Paredes			TIF: 0987095052			
Dirección: Salcedo			Email: ale_t_1991@hotmail.com			
Ciudad: Salcedo						
Descripción de las muestras:						
Producto: Harina de quinua y ajonjolí			Peso: 170 g			
Marca comercial: n/a			Tipo de envase: funda plastica			
Lote: n/a			No de muestras: una			
F. Elb.: n/a			F. Exp.: n/a			
Conservación: Ambiente: x Refrigeración: Congelación:			Almac. en Lab: 30 días			
Cierres seguridad: ninguno: x Imacios: rotos:			Muestreo por el cliente: 29 octubre 2015			
RESULTADOS OBTENIDOS						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Harina de quinua	29815917	123	Cenizas	PE01-5.4-FQ . AOAC Ed 19, 2012 923.03	%	2.09
			Proteína	PE03-5.4-FQ . AOAC Ed 19, 2012 2001.11	%(Nx6.25)	13.0
			Humedad	PE02-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10	%	9.05
			*Grasa	PE13-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2003.06	%	4.99
			*Fibra cruda	INEN 522	%	1.01
			*Carbohidratos Totales	Cálculo	%	69.9
Conds. Ambientales: 19.2 °C; 50%HR						
Nota: Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE						
 Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad						
Autorización para transferencia electrónica de resultados: Sí						GR

Nota: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".

ANEXO M

CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS PROTEICOS

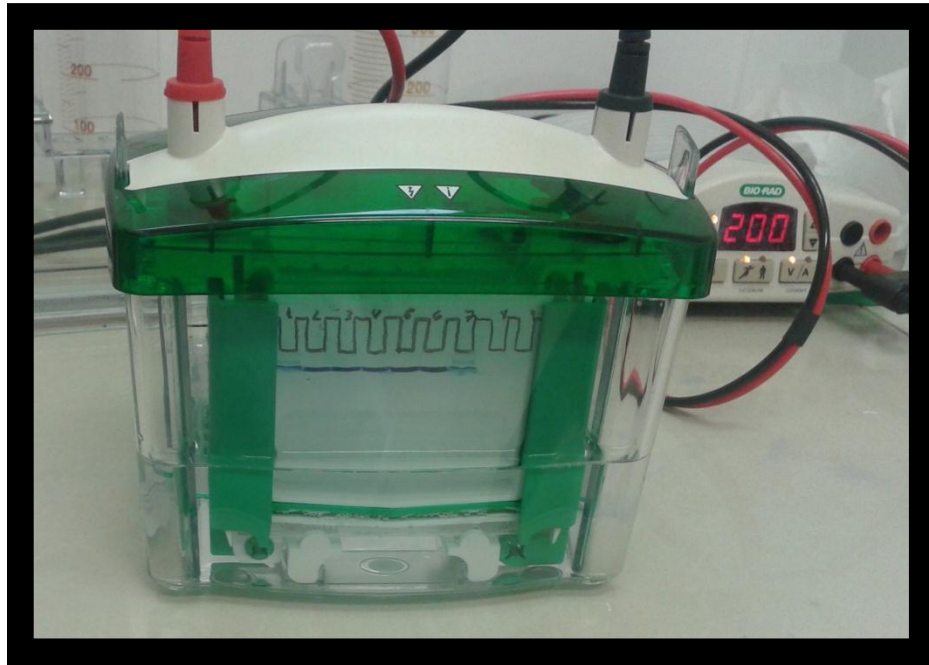


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE de la proteína aislada a pH 4,0

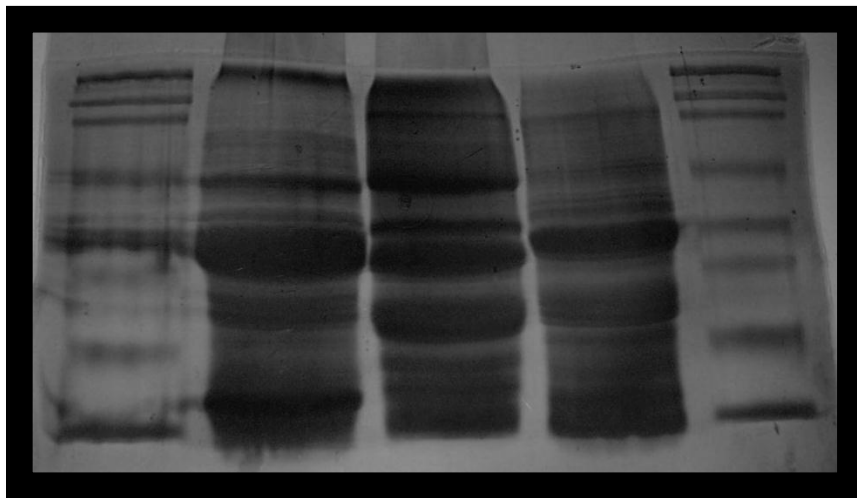


Figura 21. Geles de aislados proteicos de quinua obtenidos a pH 4, 0.

ANEXO N
FOTOGRAFIAS E IMAGENES



Figura 22. Desengrasado de la harina de quinua con n-hexano.

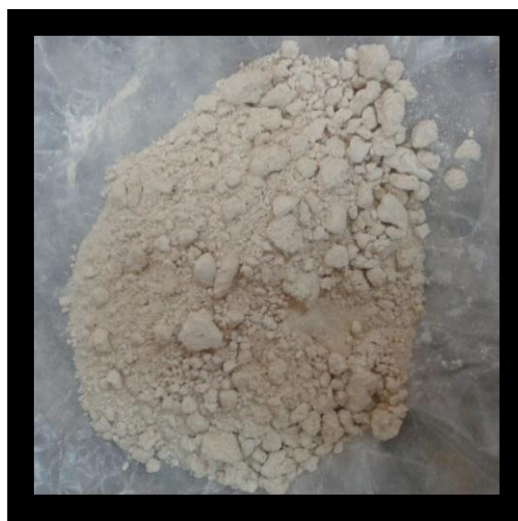


Figura 23. Secado de la harina desengrasada con n-hexano.



Figura 24. Pesado de la harina de quinua desengrasada, para extraer proteína

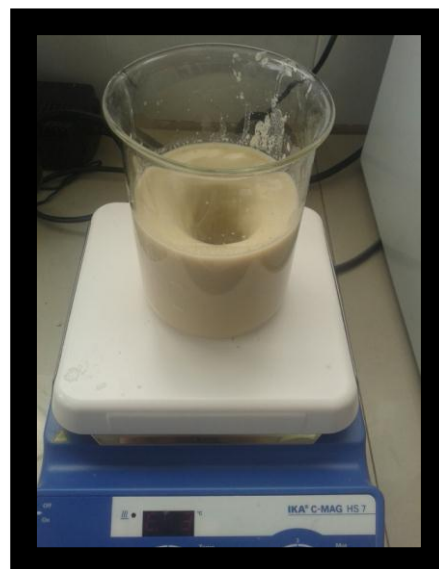


Figura 25. Agitación de la harina junto con agua 10/100 (p/v) a pH 8,0.



Figura 26. Centrifugación de la mezcla agua/harina



Figura 27. Separación del precipitado y el sobrenadante



Figura 28. Sobrenadante y torta



Figura 29. Precipitación isoelectrica de la proteína a pH 4,0 (sobrenadante)

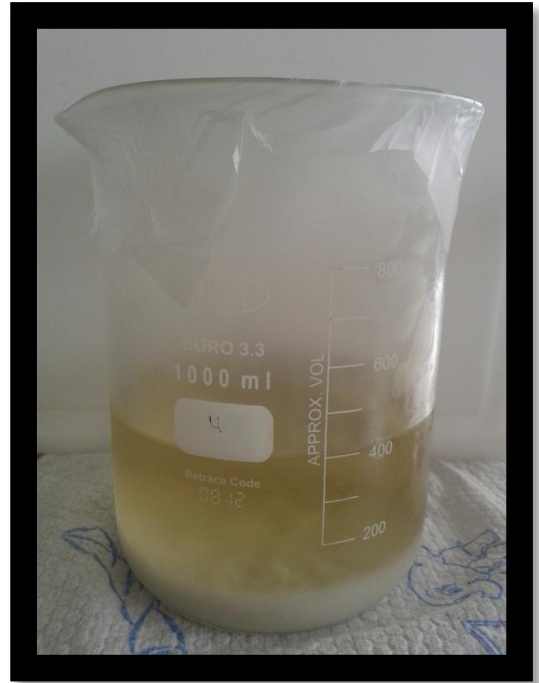


Figura 30. Precipitado de proteína de quinua



Figura 31. Liofilización de proteínas de quinua.



Figura 32. Proteína de quinua liofilizada.