

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE RECURSOS  
VEGETALES SUBUTILIZADOS CON POTENCIAL AGROALIMENTARIO**

**POR**

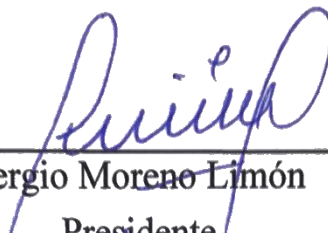
**ALDO RODRIGO GONZÁLEZ LUNA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO Y ADMINISTRACIÓN  
DE RECURSOS VEGETALES**

**NOVIEMBRE, 2018**


OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS  
DE RECURSOS VEGETALES SUBUTILIZADOS  
CON POTENCIAL AGROALIMENTARIO

Comité de Tesis



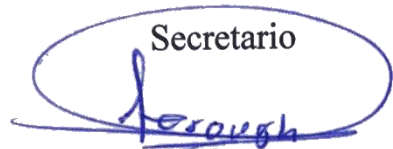
---

Sergio Moreno Limón  
Presidente



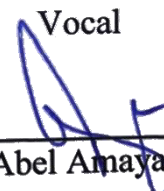
---

Abelardo Chávez Montes  
Secretario



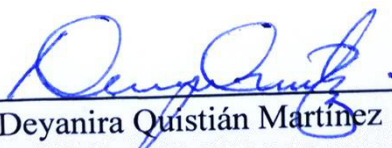
---

Rahim Foroughbakhch Pournavab  
Vocal



---

Carlos Abel Amaya Guerra  
Vocal

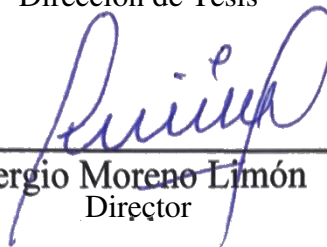


---

Deyanira Quistián Martínez  
Vocal

OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS  
DE RECURSOS VEGETALES SUBUTILIZADOS  
CON POTENCIAL AGROALIMENTARIO

Dirección de Tesis



---

Sergio Moreno Limón  
Director

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Sergio Moreno Limón**, por todas sus enseñanzas enriquecedoras, sus palabras de aliento, su paciencia y sobre todo su apoyo durante el tiempo que hemos podido compartir para la culminación de este proyecto de investigación.

Al Comité Revisor de Tesis, **Dr. Abelardo Chávez Montes**, **Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab**, **Dr. Carlos Abel Amaya Guerra** y **Dra. Deyanira Quistián Martínez**, por sus valiosas aportaciones para la finalización de esta tesis.

Al **Dr. Francisco Millán Rodríguez** una mención cálida y especial, por la disposición prestada para la realización de una estancia de investigación en los laboratorios del Grupo de Proteínas Vegetales del Instituto de la Grasa, en la ciudad de Sevilla, España, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, así como al grupo de investigadores y colaboradores del citado grupo: Dr. Justo Javier Pedroche Jiménez, Dra. María del Mar Yust Escobar, Dra. María del Carmen Millán Linares, Álvaro Villanueva Lazo, Verónica Santos Barea e Isabel Ortega Reguera. ¡Gracias miarma!

A la **Dra. María del Mar Yust Escobar** una memorable distinción, por compartir su conocimiento, brindar su tiempo y paciencia, y sobre todo por permitir el lazo de amistad durante la estancia de investigación en España.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y a su convocatoria de Beca Mixta, por brindarme el apoyo económico como becario bajo el número de registro 445782 para de este modo concluir de forma satisfactoria los estudios de posgrado.

Finalmente, a mis compañeros y amigos con quienes tuve la dicha de compartir momentos memorables estos años y que me alentaron para cumplir los objetivos y alcanzar las metas trazadas. ¡Gracias Totales!

## DEDICATORIA

Alguna vez leí la historia de cuando un agricultor planta una semilla de bambú japonés, este no crece inmediatamente, sin importar la cantidad de riego y abono que se emplee regularmente. Para que pueda desarrollar una altura por arriba de los 30 metros, requiere de más de siete años de cuidado constante, tiempo durante el cual un agricultor inexperto podría pensar que la semilla es infértil, siendo que en realidad durante este periodo el sistema radical se desarrolla y se fortalece para que posteriormente pueda crecer el árbol vigorosamente. Esta situación aplica de igual forma en la vida, puesto que nuestros objetivos y metas requieren de paciencia, tenacidad y perseverancia para lograrlas, por lo cual de no obtener los resultados a corto plazo no se debe entrar en desesperación, puesto que al igual que el bambú japonés, se requieren de buenas raíces para sentar las bases de un proyecto promisorio.

Quiero dedicar la conclusión de esta tesis, de este proyecto y de esta etapa en mi vida, en primera instancia a mi familia, el motor de mi vida, gracias por todo ese amor incondicional que durante todo este tiempo me han transmitido a la distancia y que sin su apoyo, nada de esto sería posible. En segunda instancia a mis asesores de tesis, los doctores Sergio Moreno, Abelardo Chavez, Rahim Foroughbakhch, Carlos Amaya y Deyanira Quistián, a mis asesores externos de Sevilla, gracias por su conocimiento y constante aliento para la culminación del presente proyecto. Y por ultimo, a todas esas personas maravillosas con quienes he compartido momentos especiales en mi vida: Raúl Garza, Denisse Perales, Alvaro Sánchez, Carlos Barriga, Leopoldo López, Luis Becerril, Jorge González, Omar Luevano, Felipe García, Abraham Granillo, Miguel Lopez, Brenda Medellín, Mariana Martínez, Yadira Varela, Raquel Saenz, Deyra Noriega, Erika González, Aracely Orona, Karely Alvarado, a mis compañeros de posgrado y de laboratorio, mis colegas profesores, a mis amigos del Instituto de la Grasa en Sevilla, Antonio, Maria, Sergio, Alvaro, Irati, Veronica, Manu y Maleni, a los compis europeos Lenka, Nikol, Ben, David, a mis amigos Erasmus Nicole, Dayana, Karla, Gio, Juan, Loris, Ale's, a mi familia francesa, Manon, Valena, Yan, Meg, Ivic, por ellos y los que han hecho falta ¡Gracias infinitas!

## INDICE

INDICE DE TABLAS	.....	i
INDICE DE FIGURAS	.....	vi
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	.....	x
RESUMEN	.....	xi
ABSTRACT	.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	.....	1
2. ANTECEDENTES	.....	3
2.1 <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	.....	3
2.1.1 Historia, Origen y Botánica	.....	3
2.1.2 Cultivo y Producción	.....	7
2.1.3 Composición química de la semilla	.....	10
2.1.3.1 Composición lipídica	.....	10
2.1.3.2 Fibra	.....	11
2.1.3.3 Proteínas	.....	12
2.1.3.3.1 Globulinas	.....	13
2.1.3.3.2 Albuminas	.....	13
2.1.3.4 Azúcares	.....	14
2.1.3.5 Polifenoles	.....	15
2.2 <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	.....	17
2.2.1 Historia, Origen y Botánica	.....	17
2.2.2 Cultivo y Producción	.....	22
2.2.3 Composición química de la semilla	.....	27
2.2.3.1 Composición lipídica	.....	28
2.2.3.2 Fibra	.....	28

2.2.3.3 Proteínas	29
2.2.3.4 Azúcares	31
2.2.3.5 Polifenoles	31
2.3 <i>Salvia hispanica</i> L.	32
2.3.1 Historia, Origen y Botánica	32
2.3.2 Cultivo y Producción	36
2.3.3 Composición química de la semilla	38
2.3.3.1 Composición lipídica	38
2.3.3.2 Fibra	39
2.3.3.3 Proteínas	40
2.3.3.4 Azúcares	41
2.3.3.5 Polifenoles	41
2.4 Aislados proteicos de origen vegetal	42
2.4.1 Obtención de aislados proteicos	43
2.4.2 Usos y aplicaciones de aislados proteicos	48
2.5 Hidrolizados proteicos vegetales	51
2.6 Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos en alimentación	54
2.7 Péptidos bioactivos en proteínas de reserva	57
2.7.1 Péptidos con actividad opioide	58
2.7.2 Péptidos con actividad antimicrobiana e inmunomodulante	59
2.7.3 Péptidos con actividad antioxidante	61
2.7.4 Péptidos con actividad transportadora de iones	62
2.7.5 Péptidos con actividad antihipercolesterolemica	62
2.7.6 Péptidos con actividad antitrombótica	63
2.7.7 Péptidos con actividad antihipertensiva	65
3. JUSTIFICACIÓN	68

4. HIPÓTESIS	69
5. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO	70
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
6. MATERIAL Y MÉTODOS	71
6.1 Aparatos	71
6.1.1 Cromatografía líquida	71
6.1.2 Microanalizador elemental	71
6.1.3 Espectrofotómetro	72
6.1.4 Centrífuga	72
6.1.5 Otros aparatos	72
6.2 Materiales	73
6.2.1 Material vegetal	73
6.2.2 Patrones para la identificación de proteínas (filtración en gel)	73
6.2.3 Enzimas usadas en la determinación del contenido de fibra total	74
6.2.4 Enzimas usadas en la obtención de hidrolizados proteicos para la mejora de propiedades funcionales	74
6.3 Métodos	76
6.3.1 Determinación cuantitativa del contenido graso	76
6.3.2 Determinación cuantitativa de la composición de ácidos grasos	76
6.3.3 Determinación cuantitativa de proteínas	77
6.3.4 Determinación de cenizas y humedad	77
6.3.5 Determinación de polifenoles y azúcares	77
6.3.6 Determinación de fibra total	79
6.3.7 Determinación cuantitativa de aminoácidos	80
6.3.8 Determinación de propiedades funcionales	82



6.3.8.1 Solubilidad	.....	82
6.3.8.2 Absorción de agua	.....	83
6.3.8.3 Absorción de aceite	.....	83
6.3.8.4 Actividad y estabilidad emulsificante	.....	84
6.3.8.5 Capacidad y estabilidad espumante	.....	84
6.3.8.6 Capacidad gelificante	.....	85
6.3.8.7 Capacidad de hinchamiento	.....	85
6.3.9 Determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración en gel	.....	85
6.3.10 Comparación de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida	.....	87
6.3.11 Obtención de la harina desengrasada de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i> <i>hispanica</i> L.	.....	89
6.3.12 Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	.....	89
6.3.13 Obtención de aislados proteicos de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i> <i>hispanica</i> L.	.....	90
6.3.14 Hidrólisis de proteínas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	.....	92
6.3.15 Determinación del grado de hidrólisis	.....	93
6.3.16 Simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> de los péptidos obtenidos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	.....	94
6.3.17 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i>	.....	95

<i>hispanica</i> L. tras su incubación con proteasas digestivas		
6.3.18	Determinación de péptidos bioactivos	96
6.3.18.1	Péptidos con actividad antioxidante	96
6.3.18.1.1	Capacidad para secuestrar el radical DPPH	96
6.3.18.1.2	Decoloración del $\beta$ -caroteno	97
6.3.18.1.3	Determinación del poder reductor	98
6.3.18.2	Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	99
6.3.19	Análisis estadístico	100
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
7.1	Caracterización química de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	101
7.1.1	Propiedades funcionales de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	119
7.2	Obtención de aislados proteicos de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i> <i>hispanica</i> L.	123
7.2.1	Propiedades funcionales de los aislados proteicos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	133
7.2.2	Composición aminoacídica de los aislados proteicos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	136
7.3	Obtención de hidrolizados proteicos de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i> <i>hispanica</i> L. mediante la hidrólisis con Alcalasa y	140

Flavorzima	
7.3.1 Propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	148
7.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	156
7.5 Ensayos de actividad biológica de los hidrolizados proteicos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L. obtenidos mediante Alcalasa y Flavorzima	158
7.5.1 Actividad antioxidante	158
7.5.1.1 DPPH	159
7.5.1.2 Decoloración del beta caroteno	167
7.5.1.3 Poder reductor	186
7.5.2 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	196
7.5.3 Simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> de los péptidos obtenidos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	206
7.5.4 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas de <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia</i> <i>hispanica</i> L. tras su incubación con proteasas digestivas	210
8. CONCLUSIONES	214
9. PERSPECTIVAS	215
10. REFERENCIAS	216
RESUMEN BIOGRÁFICO	250

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Volumen de producción (ton/año) de amaranto en diferentes estados mexicanos durante el periodo 1990-2010	<b>9</b>
<b>2</b>	Principales ventajas en el uso de aislados proteicos	<b>48</b>
<b>3</b>	Principales proteasas grado alimenticio disponibles comercialmente	<b>53</b>
<b>4</b>	Propiedades bioquímicas de las proteasas Alcalasa® 2.4 L y Flavourzyme® 1000 MG	<b>75</b>
<b>5</b>	Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>101</b>
<b>6</b>	Composición aminoacídica de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>102</b>
<b>7</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>105</b>
<b>8</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. y de los principales aceites vegetales comestibles	<b>105</b>
<b>9</b>	Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	<b>107</b>
<b>10</b>	Composición aminoacídica de la harina desengrasada de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	<b>108</b>
<b>11</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	<b>110</b>
<b>12</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y de los principales aceites vegetales comestibles	<b>111</b>
<b>13</b>	Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>112</b>
<b>14</b>	Composición aminoacídica de la harina desengrasada de <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>113</b>
<b>15</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>116</b>

<b>16</b>	Composición de ácidos grasos de <i>Salvia hispanica</i> L. y de los principales aceites vegetales comestibles	<b>118</b>
<b>17</b>	Propiedades tecnofuncionales de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>121</b>
<b>18</b>	Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina desengrasada de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>124</b>
<b>19</b>	Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>126</b>
<b>20</b>	Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina desengrasada de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>128</b>
<b>21</b>	Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>129</b>
<b>22</b>	Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina desengrasada de <i>S. hispanica</i> L.	<b>131</b>
<b>23</b>	Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de <i>S. hispanica</i> L.	<b>132</b>
<b>24</b>	Propiedades tecnofuncionales del aislado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>135</b>
<b>25</b>	Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>136</b>
<b>26</b>	Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	<b>138</b>
<b>27</b>	Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>139</b>
<b>28</b>	Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>143</b>

<b>29</b>	Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>145</b>
<b>30</b>	Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de <i>S. hispanica</i> L.	<b>147</b>
<b>31</b>	Propiedades tecnofuncionales del hidrolizado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>150</b>
<b>32</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Amaranto	<b>153</b>
<b>33</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Quínoa	<b>154</b>
<b>34</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Chía	<b>155</b>
<b>35</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos	<b>161</b>
<b>36</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos	<b>163</b>
<b>37</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos	<b>165</b>
<b>38</b>	Composición aminoacídica de los hidrolizados proteicos Alcalasa 60 minutos de <i>A. hypochondriacus</i> L., <i>C. quinoa</i> Willd. y <i>S. hispanica</i> L.	<b>166</b>
<b>39</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Amaranto	<b>177</b>
<b>40</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes	<b>178</b>

	tiempos de hidrólisis	
<b>41</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Quínoa	<b>180</b>
<b>42</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos de hidrólisis	<b>181</b>
<b>43</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Chía	<b>183</b>
<b>44</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos de hidrólisis	<b>184</b>
<b>45</b>	Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	<b>191</b>
<b>46</b>	Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	<b>192</b>
<b>47</b>	Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	<b>193</b>
<b>48</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	<b>202</b>
<b>49</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	<b>203</b>
<b>50</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA	<b>204</b>

	empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos	
<b>51</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la digestibilidad de la harina, aislado de hidrolizado proteico de Amaranto, Quínoa y Chía	<b>212</b>
<b>52</b>	Estadística descriptiva y ANOVA de la digestibilidad por especie de la harina, aislado de hidrolizado proteico de Amaranto, Quínoa y Chía	<b>212</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Morfología de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	<b>5</b>
<b>2</b>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. a) habito; b) bráctea; c) tépalo; d) flor masculina; e) flor femenina	<b>6</b>
<b>3</b>	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Izquierda) forma de panoja amarantiforme; derecha) forma de panoja glomerulada	<b>20</b>
<b>4</b>	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd. a) habito; b) flor; c) semilla; d) corte de semilla	<b>21</b>
<b>5</b>	Distribución geográfica de la producción mundial de quínoa	<b>25</b>
<b>6</b>	Superficie cosechada de quínoa en tres países Andinos en cinco años referenciales	<b>25</b>
<b>7</b>	Producción de quínoa en tres países Andinos en cinco años referenciales	<b>26</b>
<b>8</b>	<i>Salvia hispanica</i> L. Inflorescencia	<b>32</b>
<b>9</b>	<i>Salvia hispanica</i> L. Habito, inflorescencia y semilla	<b>35</b>
<b>10</b>	Obtención de aislados proteicos a partir de harinas desengrasadas mediante extracción alcalina y precipitación isoeléctrica	<b>45</b>
<b>11</b>	Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de azúcares solubles	<b>78</b>
<b>12</b>	Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de polifenoles	<b>79</b>
<b>13</b>	Perfil cromatográfico obtenido tras el análisis de la composición aminoacídica de BSA mediante HPLC	<b>81</b>
<b>14</b>	Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de triptófano	<b>82</b>
<b>15</b>	Recta de calibración obtenida para la determinación de los pesos moleculares mediante la columna de filtración en gel Superose 12 HR	<b>86</b>

<b>16</b>	Proceso de obtención de aislados proteicos a partir de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>91</b>
<b>17</b>	Solubilidad proteica de la harina desengrasada de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L.	<b>120</b>
<b>18</b>	Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>124</b>
<b>19</b>	Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>127</b>
<b>20</b>	Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de <i>S. hispanica</i> L.	<b>130</b>
<b>21</b>	Solubilidad proteica de la harina desengrasada y el aislado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L. frente a pH	<b>134</b>
<b>22</b>	Grado de hidrólisis a través del tiempo de <i>A. hypochondriacus</i> L. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima	<b>142</b>
<b>23</b>	Grado de hidrólisis a través del tiempo de <i>C. quinoa</i> Willd. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima	<b>144</b>
<b>24</b>	Grado de hidrólisis a través del tiempo de <i>S. hispanica</i> L. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima	<b>146</b>
<b>25</b>	Solubilidad proteica de la harina desengrasada, el aislado e hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. y <i>Salvia hispanica</i> L. frente al pH	<b>149</b>
<b>26</b>	Perfil de pesos moleculares del aislado e hidrolizado proteico de <i>A. hypochondriacus</i> L., <i>C. quinoa</i> Willd. y <i>S. hispanica</i> L.	<b>152</b>
<b>27</b>	Gel de poliacrilamida con dodecilhidrogenosulfato sódico (SDS-PAGE) de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L., <i>C. quinoa</i> Willd. y <i>S. hispanica</i> L.	<b>156</b>
<b>28</b>	Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de	<b>160</b>

	<i>A. hypochondriacus</i> L.	
<b>29</b>	Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>162</b>
<b>30</b>	Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L.	<b>164</b>
<b>31</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L. (Alcalasa)	<b>168</b>
<b>32</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L. (Flavorzima)	<b>169</b>
<b>33</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L. (Alcalasa + Flavorzima)	<b>170</b>
<b>34</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd. (Alcalasa)	<b>171</b>
<b>35</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd. (Flavorzima)	<b>172</b>
<b>36</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd. (Alcalasa + Flavorzima)	<b>173</b>
<b>37</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. (Alcalasa)	<b>174</b>
<b>38</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. (Flavorzima)	<b>175</b>
<b>39</b>	Indice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. (Alcalasa + Flavorzima)	<b>176</b>
<b>40</b>	Poder reductor de los hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>188</b>
<b>41</b>	Poder reductor de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>189</b>
<b>42</b>	Poder reductor de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L.	<b>190</b>
<b>43</b>	Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>198</b>

<b>44</b>	Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>199</b>
<b>45</b>	Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos de <i>S. hispanica</i> L.	<b>200</b>
<b>46</b>	Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de <i>A. hypochondriacus</i> L.	<b>207</b>
<b>47</b>	Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de <i>C. quinoa</i> Willd.	<b>207</b>
<b>48</b>	Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de <i>S. hispanica</i> L.	<b>208</b>
<b>49</b>	Porcentaje de digestibilidad de la harina, aislado de hidrolizado proteico de <i>A. hypochondriacus</i> L., <i>C. quinoa</i> Willd. y <i>S.</i> <i>hispanica</i> L.	<b>211</b>

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/Abreviatura	Descripción
AAI	Inhibidor de alfa amilasa
AGE	productos finales de glicación
ALA	Acido alfa-linolénico
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metil-fenol
DHA	Acido docosahexaenoico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracil
EAG	Equivalentes de acido gálico
ECA/ACE	Enzima convertidora de angiotensina
EPA	Acido eicosapentaenoico
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
FDT	Fibra dietética total
FPLC	Cromatografía líquida de la proteína rápida
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro
GH	Grado de hidrólisis
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
pI	Punto isoelectrico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilhidrogenosulfato sódico
TCMA	Tasa de crecimiento media anual
TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico
UA/AU	Unidades Anson
ULAP/LAPU	Unidades de leucina aminopeptidasa

## RESUMEN

En la actualidad, la bioconversión de residuos agroindustriales en productos de mayor valor añadido (enzimas, proteínas unicelulares, pigmentos, antibióticos, etc.), además del interés económico, considera el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue explorar residuos agroindustriales con capacidad antioxidante y antihipertensiva. La obtención de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática extensiva y secuencial (empleando Alcalasa y Flavorzima) de aislados proteicos obtenidos a partir de harinas desengrasadas de amaranto, quínoa y chía, resulta ser una estrategia interesante para el aprovechamiento de dichos residuos, los cuales pueden llegar a ejercer efectos beneficiosos sobre alguna función fisiológica. Para evaluar la actividad antioxidante se realizaron tres ensayos: la capacidad para secuestrar el radical DPPH, según el método de Wu *et al.*, (2003) por espectrofotometría a 517 nm; la decoloración del  $\beta$ -caroteno, según el método de Miller (1971) empleando un lector de microplacas de 96 pocillos a 470 nm a 45°C con tiempos de 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos; y la determinación del poder reductor, según el método de Oyaizu (1986) por espectrofotometría a 700 nm; por otra parte, para evaluar la actividad antihipertensiva se realizó un ensayo para determinar los péptidos con capacidad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, según el método de Santandreu y Toldra (2006) empleando un lector de fluorescencia en microplacas a 420 nm. Los resultados muestran que los hidrolizados proteicos obtenidos del aislado de chía presentaron la mayor actividad antioxidante (menor grado de decoloración del  $\beta$ -caroteno, mejor poder reductor y una captación de DPPH entre el 70-80%, en comparación con BHT). Por otra parte, los péptidos obtenidos empleando Alcalasa en las tres especies mostraron mayor grado de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que los obtenidos con Flavorzima. Además, los péptidos obtenidos por hidrólisis extensiva con Alcalasa durante 60 minutos en las tres especies mostraron un mayor porcentaje de solubilidad y digestibilidad que sus aislados proteicos, lo que intuye que puedan ser empleados como una alternativa agroalimentaria de interés para la elaboración de alimentos funcionales como sustituto alimentario por sus características bioactivas y biofuncionales.

**Palabras clave:** subproductos agroindustriales, péptidos bioactivos, alimentos funcionales.

## **ABSTRACT**

At present, the bioconversion of agroindustrial residues into higher value-added products (enzymes, single-cell proteins, pigments, antibiotics, etc.), in addition to economic interest, considers the development of technologies aimed at a sustainable transformation of natural resources. Therefore, the objective of this study was to explore agroindustrial residues with antioxidant and antihypertensive capacity. Obtaining bioactive peptides from the extensive and sequential enzymatic hydrolysis (using Alcalase and Flavourzyme) of protein isolates obtained from defatted flours of amaranth, quinoa and chia, turns out to be an interesting strategy for the use of these residues, which may have beneficial effects on some physiological function. To evaluate the antioxidant activity three tests were performed: the ability to sequester the radical DPPH, according to the method of Wu et al., (2003) by spectrophotometry at 517 nm; discoloration of  $\beta$ -carotene according to the method of Miller (1971) using a 96-well microplate reader at 470 nm and 45 ° C at 0, 30, 60, 90, 120 and 150 minutes; and the determination of reducing power, according to the method of Oyaizu (1986) by spectrophotometry at 700 nm; on the other hand, to evaluate the antihypertensive activity, an assay was performed to determine the peptides with inhibitory capacity of the angiotensin converting enzyme, according to the method of Santandreu and Toldra (2006) using a fluorescence reader in microplates at 420 nm. The results show that the protein hydrolysates obtained from the chia isolate showed the highest antioxidant activity (lower degree of discoloration of  $\beta$ -carotene, better reducing power and uptake of DPPH between 70-80%, compared to BHT). On the other hand, the peptides obtained using Alcalase in all three species showed a greater degree of inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). In addition, the peptides obtained by extensive hydrolysis with Alcalase for 60 minutes in all three species showed a higher percentage of solubility and digestibility than their protein isolates, which suggests that they can be used as an agri-food alternative of interest for the elaboration of functional foods as substitute for its bioactive and biofunctional characteristics.

**Key words:** agroindustrial waste, bioactive peptides, functional foods.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante sus procesos industriales, un gran número de empresas generan subproductos de desecho a partir de una amplia diversidad de materias primas, como es el caso de semillas rotas o pequeñas, las cuales son rechazadas por el consumidor, o bien harinas desengrasadas, las cuales no son contempladas para su posterior aprovechamiento. Es por ello que en la actualidad, la bioconversión de residuos agroindustriales en productos de interés comercial mediante procesos de extracción directos o de transformación por vía química o microbiológica de acuerdo con Moldes *et al.* (2002) ha tomado un auge importante, dado que además del interés económico que ello supone para la producción de productos de mayor valor añadido (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de subproductos agroindustriales tiene incidencia en la preservación de la calidad del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales.

Partiendo de lo anterior, los aislados proteicos vegetales, los cuales pueden obtenerse a partir del aprovechamiento de residuos agroindustriales, como es el caso de las harinas desengrasadas, cuentan con una amplia gama de aplicaciones que pueden ayudar a mejorar las propiedades funcionales de los alimentos e incluso ser empleadas para la elaboración de suplementos proteicos, para el tratamiento de enfermedades crónicas o para la obtención de péptidos bioactivos. Sin embargo, los aislados proteicos suelen presentar una baja solubilidad, además de una potencial alergenicidad, ante lo cual el empleo de la hidrólisis enzimática ha resultado en una herramienta interesante para



solucionar dicho problema. Una estrategia interesante para el aprovechamiento de dichos residuos es la obtención de péptidos bioactivos, los cuales son secuencias cortas de aminoácidos, inactivas dentro de la proteína intacta, pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento por el individuo o por un proceso previo a la ingesta, como por ejemplo mediante hidrólisis enzimática, que además pueden llegar a ejercer efectos beneficios sobre alguna función fisiológica.

De este modo, la utilización de dichos péptidos, los cuales pueden presentar actividad antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria, etc., resulta estar influenciada por una serie de factores. Entre estos factores destacan el aspecto funcional, en el que se busca el péptido o grupo de péptidos que presenten la mejor actividad biológica *in vitro*, y el aspecto económico, es decir, que resulte redituable la obtención de dicho péptido y que no involucre un gasto importante de tiempo y dinero.

Dentro de las nuevas tendencias alimenticias, el empleo del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), la quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la chía (*Salvia hispanica* L.) han tomado un auge importante en distintos sectores comerciales, donde la industria fomenta la elaboración de productos lácteos como yogurts y batidos que contengan su semilla debido al interesante aporte de fibra y proteína. Es por ello que, dentro de la rama de innovación y desarrollo de nuevos productos, resulta bastante interesante la elaboración de alimentos funcionales a partir de los coproductos de estas materias primas mediante los cuales se obtengan productos benéficos tanto desde el punto de vista nutricional como para la salud humana y que además colaboren en el tratamiento de enfermedades crónicas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Amaranthus hypochondriacus* L.

#### 2.1.1 Historia, Origen y Botánica

La familia Amaranthaceae comprende 60 generos y cerca de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical, que se adaptan bien a climas templados. Sus principales centros de distribución son los trópicos de América y la India, aun cuando en los trópicos de África y Australia existe un importante numero de especies (**Feine et al., 1979; Sauer, 1967**).

El género *Amaranthus* comprende hierbas anuales o perennes, monoicas, dioicas o poligamodioicas, erguidas o postradas, glabras o pubescentes; hojas alternas, pecioladas, enteras o con el borde ondulado, con frecuencia mucronadas; flores pequeñas, bracteadas o bibracteoladas, hermafroditas o unisexuales, verdosas o rojizas, dispuestas en glomérulos axilares, espigados o paniculados; tépalos 5 (2 o 3); estambres generalmente 5, anteras tetraloculares; ovario ovoide, comprimido, estilo corto, ausente, estigmas 2 o 3; utrículo entero o 2 a 3 dentado en el apice, indehiscente, circuncisil o irregularmente dehiscente, membranáceo o coriáceo; semillas erguidas, comprimidas, lisas, embrión anular. Existen alrededor de unas 50 especies distribuidas en regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios (**Rzedowski, 1979**).

Estudios arqueobotánicos realizados en las cuencas del Valle de Tehuacán, han revelado que nuestros antepasados cultivaron, desde los años 9000 a 5000 a. C., una mayor variedad de plantas comestibles que sus contemporáneos europeos, entre las que

se encuentran diversas clases de chile, maíz, frijol, aguacate, cacahuete, tomate, ciruela, zapote, guayaba, calabaza y amaranto, el cual actualmente en diversas regiones recibe el nombre de alegría. La especie *A. cruentus* L., tiene una antigüedad de 4000 años, y sus semillas fueron halladas en grietas de la cueva de Cozcatlán, en Tehuacán, Puebla. Mientras que las muestras arqueobotánicas de *A. hypochondriacus* L., datan de 500 años antes del descubrimiento de América (**Barros y Buenrostro, 1997**).

En la Quemada, Zacatecas, se han podido identificar restos de maíz, frijol, calabaza, maguey, nopal y chile, y también se han encontrado plantas de los generos *Chenopodium* y *Amaranthus*, aunque aun no se puede precisar si crecían silvestres o se cultivaban. De época posterior son los restos de inflorescencias y semillas de amaranto de color claro y oscuro, bien conservadas, que se han encontrado en Arizona, en una población habitada por los indios salado, entre los años 1350 y 1400. Este grupo, fusión de los indios hohokam y anasazi, practicó el cultivo de regadío con maíz, frijol, calabaza y el propio amaranto (**Barros y Buenrostro, 1997**).

Los amarantos fueron nombrados *huauhtli* por los aztecas. En el náhuatl del siglo XVI *huauh* fue un radical nominal independiente, no relacionado con alguna otra raíz; *huaqui*, “secar”, daría el nombre *huactli* o “una cosa secada en el exterior”, palabra que no se puede derivar de alguna raíz uto-azteca (**Costea y Tardif, 2003**).

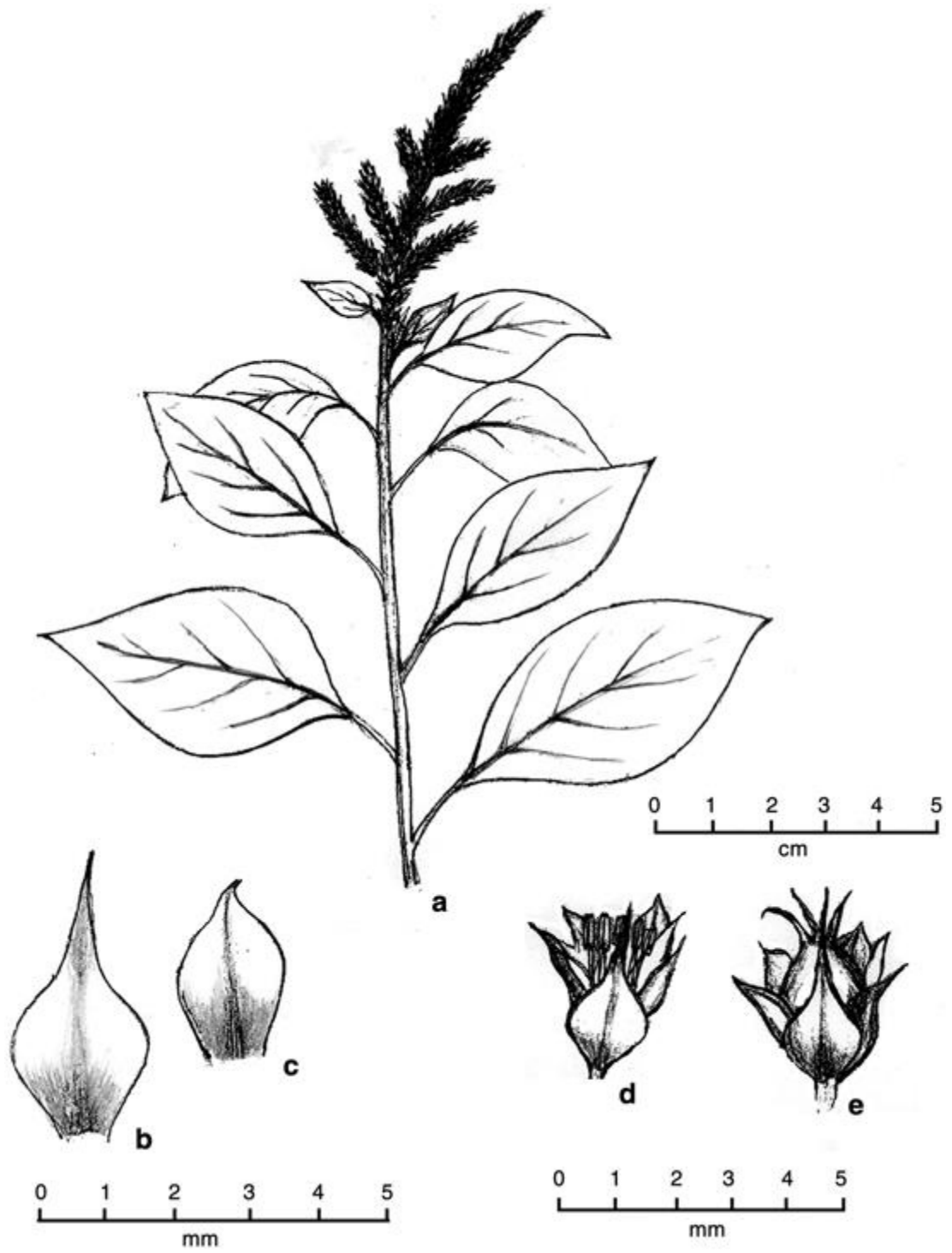
Por otra parte, la denominación de la especie *Amaranthus hypochondriacus* L. (*Syn. A. leucocarpus* S. Watson) ha sufrido cambios en el transcurso del tiempo (Figura 1), en el cual se le ha conocido como *A. frumentaceus*, *A. anardan*, *A. hybridus* var. *Erythrostachys*, *A. leucocarpus* y *A. leocospermus*, aunque el nombre que actualmente

es mas aceptado es el que en 1753 le dio Linneo que es *A. hypochondriacus* (Sauer, 1950; Sauer, 1967; Singh, 1961).



**Figura 1.** Morfología de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Son plantas anuales, herbáceas. Presentan tallo simple o ramificado, alcanzan alturas de hasta tres metros. Tienen hojas simples, alternas, elípticas u ovado-oblongas, apice agudo acuminado y base cuneada o aguda. Inflorescencia de gran tamaño muy densa, erecta y espinosa con espigas y panículas laterales. Flores pentámeras, tépalos ligeramente curvados y más largos que los tépalos de las otras especies para producción de grano (Figura 2). Sus semillas son de color blanco, dorado, café y negro. Esta especie también es utilizada como ornamental por sus inflorescencias que son muy vistosas (Grubben y Van Sloten, 1981).



**Figura 2.** *Amaranthus hypochondriacus* L. a) habito; b) bráctea; c) tépalo; d) flor masculina; e) flor femenina.

### 2.1.2. Cultivo y Producción

El cultivo de amaranto tiene gran relevancia en México desde tiempos prehispánicos, principalmente por su uso en rituales religiosos y en la dieta humana.

**Ayala et al. (2012)** han descrito de forma detallada el contexto internacional y nacional del cultivo de amaranto y los principales modelos de producción de amaranto en México, lo cual resulta clave para comprender la importancia de este cultivo. Los principales datos extraídos de su investigación se describen a continuación:

De acuerdo a la **FAO (1997)**, el cultivo de amaranto tanto en el área andina como en las costas de los países de América, tiene enormes posibilidades y perspectivas técnicas de desarrollo, puesto que las características agroclimáticas, edáficas y tecnológicas son adecuadas y propicias para el cultivo, transformación e industrialización. Además, el uso y consumo de este producto de alto valor proteico tiene como ventaja una considerable disminución de los niveles de desnutrición existente en muchos países en desarrollo.

La superficie de siembra se ha incrementado tanto por sus cualidades alimenticias como por su capacidad de adaptabilidad a la mayoría de las condiciones climáticas de México.

A pesar de que no existen estadísticas oficiales que permitan conocer el comportamiento de la producción y comercio de este producto, de acuerdo a **Jacobsen et al. (2002)**, en los últimos veinte años ha existido un aumento notorio en la investigación y producción de amaranto en América, Asia, África, y varios países del este de Europa.

Los principales países que cultivan el grano de amaranto son China, India, Kenya, México, Nepal, Perú, Estados Unidos y Rusia (**Bale y Kauffman, 1992**).

El principal productor de este cultivo es China, según las estadísticas de *Export to China* en 2012, el cual abastece gran parte del mercado internacional. China se colocó como el principal exportador durante 2005 a 2010, donde los principales países compradores fueron Japón (31%), Estados Unidos (15%) y Holanda (9%).

En referencia al contexto nacional del cultivo de amaranto en México, la **SAGARPA (2012)** describe que la tasa de crecimiento media anual (TCMA) de la producción de amaranto de la superficie sembrada de 1982 a 2010 fue de 9.82%, lo cual refleja la importancia que ha adquirido el amaranto en los últimos años.

Por otra parte, las unidades de producción se caracterizan por ser principalmente ejidales y muy pocas superficies son pequeña propiedad. Otra característica que se resalta, es que aproximadamente el 95% de los productores son minifundistas con extensiones individuales de 1.5 hectareas en promedio y el 5% restante son productores cuyos predios son de alrededor de 5 hectareas (**INEGI, 2009**). El 97% de la producción de amaranto es de temporal y riego, por lo que su manejo agronómico esta basado y calendarizado en torno al periodo de lluvias de las regiones productoras, de tal manera que dicho manejo es ligeramente diferente en cada región, pero su ciclo de producción es en primavera verano.

De acuerdo a datos de **SAGARPA-SIACON (2012)**, la producción de amaranto se concentra en la zona central de México, en donde destacan los estados de Puebla, Morelos, Tlaxcala y el Estado de México. También se siembra en menores superficies y de manera mas esporádica en Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo,

Michoacán, Oaxaca, Querétaro, Nayarit, San Luis Potosí y Veracruz, en donde cabe resaltar que el comportamiento de la producción por estado ha variado a través de los años (Tabla 1).

**Tabla 1.** Volumen de producción (ton/año) de amaranto en diferentes estados mexicanos durante el periodo 1990-2010

Estado	1990	2000	2008	2009	2010	Promedio*	Participación en la producción (%)
Puebla	193	3059	2511	3356	2489	2785	66
México	60	147	408	440	491	446	11
Morelos	138	506	575	325	303	401	9
Guanajuato		7			225	225	5
Tlaxcala	146	276	190	196	193	193	5
DF (Cd. de México)	109	218	164	151	165	160	4
Jalisco				19		19	0
Querétaro			9		5	7	0
Oaxaca		7	7	7		7	0
Campeche		20					
Guerrero	25						-
<b>Total</b>	<b>671</b>	<b>4240</b>	<b>3863</b>	<b>4493</b>	<b>3870</b>	<b>4243</b>	<b>100</b>

\* Se considera el promedio de la producción 2008/10

Fuente: SAGARPA-SIACON (2012) En: El cultivo de amaranto en México, descripción de la cadena, implicaciones y retos.

Las siembras de temporal (primavera-verano) son de tres tipos: en Morelos se siembra la semilla al inicio del periodo de lluvias; en los estados de México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala, se espera el establecimiento del temporal; y en Ciudad de México se siembra por trasplante de almácigos al establecerse el temporal. Por otro lado, las siembras con riego se realizan en los estados de Baja California Sur, Chihuahua e Hidalgo.

A pesar de que las unidades de producción se caracterizan por ser pequeñas, su producción va en aumento. Este cultivo constituye una importante fuente de empleo en actividades agrícolas, en procesamiento agroindustrial, en comercialización, etc. Sin embargo, es necesario que se haga mayor promoción de los beneficios del cultivo de



amaranto entre los consumidores para que su demanda incremente y pueda ser considerado como un cultivo básico y estratégico para México.

### **2.1.3. Composición química de la semilla**

La composición proximal de la semilla de amaranto es inconsistente entre y dentro de especies, pero en promedio esta compuesta de 13-21% de proteína cruda, 5-11% de grasa cruda, 48-69% de almidón, 3-5% de fibra dietética y 2-5% de cenizas (Barba de la Rosa *et al.*, 1992).

#### **2.1.3.1. Composición lipídica**

El contenido del aceite en las distintas especies del género *Amaranthus* varía en un amplio rango de valores. Así, el grano de amaranto tiene mayor contenido de lípidos que la mayoría de los cereales, en el cual se estima que aproximadamente el 76% de los ácidos grasos son insaturados. La proporción de ácido graso linoleico es 25 a 62%, ácido oleico 19 a 35%, ácido palmítico 12 a 25%, ácido esteárico 2 a 8.6% y ácido linolénico 0.3 a 2.2%. Con respecto a la proporción de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados del aceite de grano de amaranto, está oscila entre 0.26 y 0.31%. Se ha descrito que el aceite de amaranto contiene grandes cantidades de escualeno (2 a 7% o incluso más de 8% en aceite refinado), el cual es un compuesto a menudo utilizado como lubricante para instrumentos electrónicos finos, en cosmética y medicina, obtenido

principalmente de animales como la ballena y el tiburón (**Becker *et al.*, 1981; Berghofer y Schoenlechner, 2002**).

El escualeno es un hidrocarburo altamente insaturado, un triterpeno, conocido como el precursor bioquímico obligado de los esteroides. De acuerdo con los estudios de **Kopicová y Vavreinová (2007)**, el consumo del escualeno es contradictorio desde el punto de vista nutricional. Los resultados de algunas investigaciones indican un aumento del nivel de colesterol LDL en el plasma sanguíneo de humanos y hámsters, mientras que otros afirman que una dieta alta en escualeno no eleva los niveles de triacilglicéridos y colesterol en el suero sanguíneo, mientras que las concentraciones de colesterol fecal y sus derivados no polares, así como los ácidos biliares, aumentan drásticamente. Sin embargo, las propiedades antibacterianas del escualeno, sus efectos antioxidantes y antitumorales en la carcinogénesis se demuestran científicamente y se aceptan.

La semilla de amaranto contiene esteroides en concentraciones de 0.27 a 0.32 mg/g (**Leon-Camacho *et al.*, 2001**). La concentración de fosfolípidos en el aceite de amaranto es relativamente baja (alrededor del 5%) y el contenido de tocoferoles varía de 191 mg/kg (**Becker, 1994**) a 2 000 mg/kg en aceite (**Berghofer y Schoenlechner, 2002**).

### **2.1.3.2. Fibra**

En amaranto, el contenido en fibra de la semilla se ha observado que varía de acuerdo al color de la misma. La semilla pálida contiene un 8% de fibra dietética, mientras que la semilla de color negro presenta un 15%. Con respecto al contenido de

fibra soluble, la primera contiene de 30 a 40% y la segunda un 18% (**Schnetzler y Breene, 1994**). **Tosi et al. (2001)** informaron un 14.2% de fibra dietética en la harina de *A. cruentus* (8.1% soluble, 6.1% insoluble). Con diferentes procedimientos utilizados de prensado, tamizado y clasificación neumática, estos autores lograron fracciones de harina con una mayor proporción de fibra dietética, alcanzando valores de 32.1 a 70.8 por ciento.

### **2.1.3.3. Proteínas**

La harina desengrasada de las especies del género *Amaranthus* contiene una fracción proteica promedio de 15%, encontrándose *A. hypochondriacus* entre las especies con un contenido ligeramente superior (15.7%) de acuerdo con **Grobelnik Mlakar et al. (2009)**. Las proteínas tienen una alta digestibilidad (cercana al 90%) y son ricas en lisina (4.9 a 6.1 g/100 g proteína), que normalmente aparece en los granos como aminoácido limitante. Esta alta concentración de lisina se complementa con un contenido elevado de aminoácidos azufrados (2-5%), superior a lo descrito en las leguminosas más importantes (1.4% aproximadamente), como el chícharo, el frijol y la soya (**Gorinstein y Moshe, 1991**). Esta composición de aminoácidos extremadamente equilibrada es debido a que el 65% de sus proteínas se encuentran en el embrión y solo el 35% en el perisperma, mientras que en otros granos prevalecen los aminoácidos en el endospermo (cerca del 85%) y son más deficientes en aminoácidos esenciales (**Senft, 1979; Betchart et al., 1981**).

### 2.1.3.3.1. Globulinas

Debido a la gran funcionalidad de la fracción globulina y a que se encuentra en un porcentaje importante en la semilla de amaranto, ha existido gran interés en caracterizarlas. **Konishi *et al.* (1985)**, caracterizaron una globulina de amaranto con peso de 440 kDa con un coeficiente de sedimentación de 12.7S. Esta proteína está formada por las subunidades ácidas y básicas de 36 y 32 kDa, y de 20 y 18 kDa, respectivamente. **Barba de la Rosa *et al.* (1992)**, reportaron por primera vez la presencia de dos tipos de globulinas (7S y 11S) en amaranto. Las globulinas 11S de amaranto mostraron el fenómeno de asociación-disociación presente en las proteínas de soya. **Barba de la Rosa *et al.* (1996)**, aislaron y caracterizaron el gen de una globulina 11S de amaranto, la cual presenta un alto contenido de metionina. **Konishi y Yoshimoto (1989)**, reportaron que la estabilidad y actividad de la emulsión de globulinas de amaranto son alrededor del doble que las reportadas para la proteína de soya y menores que las de la caseína, además de demostrar que la globulina es relativamente estable al calor. Estos estudios fueron validados por el análisis estructural, confirmando que la alta estabilidad térmica y las buenas propiedades emulsificantes de la globulina de amaranto se deben al balance entre la hidrofobicidad de su superficie (**Tandang-Silvas *et al.*, 2012**).

### 2.1.3.3.2. Albuminas

En amaranto las albuminas representan una fracción importante de las proteínas de reserva. De esta fracción se han aislado proteínas de alto valor nutricional, como las

proteínas ricas en metionina, péptidos con actividad antimicrobiana, inhibidores de proteasas, inhibidores de alfa amilasa y lectinas.

Por ejemplo, en la fracción 2S de albuminas de amaranto se encuentra un grupo de proteínas de aproximadamente 18 kDa conocido como proteínas ricas en metionina (2SMMRPs) de acuerdo con **Segura-Nieto *et al.* (1994)**. Por otra parte, un gen de albumina de *A. hypochondriacus* L. que codifica para una proteína de 35 kDa con altas cantidades de aminoácidos esenciales, denominada AmA1, ha sido empleada para transformar el trigo panadero y la papa, incrementando significativamente el contenido de proteína y aminoácidos esenciales en estas cosechas (**Tamás *et al.*, 2009; Chakraborty *et al.*, 2010**). En lo que respecta a la actividad antimicrobiana, se han aislado péptidos de *A. caudatus* L. y *A. retroflexus* L. los cuales fueron denominados como Ac-AMP y Ar-AMP. Los Ac-AMPs inhiben el crecimiento de hongos con mayor potencia que otros péptidos fúngicos (**Broekaert *et al.*, 1992**). En amaranto se han descrito al menos 13 inhibidores de tripsina altamente termoestables reteniendo el 20% de su actividad original después de ser tratados durante 7 horas a 100°C (**Koeppe *et al.*, 1985**). Adicionalmente, fue descrito el aislamiento de un inhibidor de alfa amilasa (AAI) de 31 residuos de aminoácidos (**Chagolla-Lopez *et al.*, 1994**).

#### **2.1.3.4. Azúcares**

El contenido en carbohidratos de las harinas desengrasadas de *Amaranthus* es relativamente alto, donde el almidón de amaranto contiene principalmente amilopectina (88.9% a 99.9%) y se clasifica así como almidón de tipo ceroso con algunas

características únicas (alta viscosidad y gelatinización a altas temperaturas) en comparación con almidones normales con contenido de amilasa entre 17-24%. Los gránulos de almidón de amaranto son extremadamente pequeños (0.8 a 2.5  $\mu\text{m}$ ) en comparación con el tamaño de gránulos de almidón de otros granos como arroz (3 a 8  $\mu\text{m}$ ), trigo (3 a 34  $\mu\text{m}$ ) y maíz (5 a 25 $\mu$ ). Los gránulos más pequeños tienen una mayor capacidad de unión al agua, mayor poder de hinchamiento, menor temperatura de gelatinización y alta resistencia a las amilasas. Debido a esto, el almidón de amaranto muestra buenas propiedades de gelatinización y estabilidad a la congelación/descongelación, las cuales son bien apreciadas en la industria alimentaria (**Breene, 1991; López *et al.*, 1994; Williams y Brenner, 1995; Pal *et al.*, 2001**). Sin embargo, se debe tener en cuenta la amplia diversidad genética de las propiedades físicas del almidón dentro y entre especies, así como la variación de todos los demás constituyentes (proteínas, lípidos, minerales) que influyen en las propiedades funcionales del almidón al seleccionar los genotipos para un propósito en particular.

### **2.1.3.5. Polifenoles**

La harina de las semillas de amaranto contiene polifenoles (flavonoides) con una capacidad antioxidante relativamente alta. Por este motivo, el amaranto ha sido recomendado para su uso en dietas balanceadas (**Gorinstein *et al.*, 2007**). **Barba de la Rosa *et al* (2009)**, identificaron y cuantificaron tres polifenoles en la semilla de amaranto (rutina, isoquercitrina y nicotiflorin), de los cuales ya se había reportado la presencia de rutina en las hojas de amaranto (**Suryavanshi *et al.*, 2007**).

Se ha observado que estos tres polifenoles se degradan fácilmente en el intestino de humanos y animales debido a la abundancia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa que libera el resto aglicónico de las moléculas (**Donovan *et al.*, 2007**). La rutina y sus metabolitos pueden modular eficazmente la formación avanzada de productos finales de glicación (AGE), que esta asociada con numerosas patologías. Las enfermedades clínicas posiblemente aceleradas por AGE incluyen neuropatía, nefropatía, retinopatía, rigidez articular, cataratas seniles, enfermedad de Alzheimer y enfermedad cardiovascular (**Cervantes-Laurean *et al.*, 2006**).

Por otra parte, se ha demostrado que los polifenoles como la quercetina sirven como defensa protectora contra el daño oxidativo *in vivo* (**Meyers *et al.*, 2008**). Se ha afirmado que el nicotiflorin tiene efectos protectores sobre la reducción de la disfunción de la memoria (**Huang *et al.*, 2007**). Además, otros resultados han demostrado que puede asumir un papel terapéutico potencial en el tratamiento de la enfermedad isquémica cerebral (**Li *et al.*, 2006**).

## 2.2. *Chenopodium quinoa* Willd.

### 2.2.1 Historia, Origen y Botánica

Dentro de la familia Chenopodiaceae, el principal género es *Chenopodium*, el cual tiene una amplia distribución mundial con cerca de 250 especies (Giusti, 1970). En el existen especies cultivadas como plantas alimenticias, por ejemplo, como productoras de grano se encuentran *Chenopodium quinoa* Willd. y *Chenopodium pallidicaule* Aellen, en Sudamérica, como verduras *Chenopodium nuttaliae* Safford y *Chenopodium ambrosioides* L. en México, mientras que como verduras o medicinales en Sudamérica están *Chenopodium carnosolum* Moq. y *Chenopodium ambrosioides* L.

El género *Chenopodium* ha sido cultivado en varias áreas geográficas del mundo: *Chenopodium álbum* L. en Europa; *Chenopodium giganteum* D. en Asia Central; *Chenopodium berlandieri* Moq. var. *Nuttaliae* en América Central; y *Chenopodium pallidicaule* y *Chenopodium quinoa* en América del Sur. De igual forma, *Chenopodium berlandieri* se encuentra distribuida en Norte América y *Chenopodium hircinum* en los Andes y la pampa Argentina en Sudamérica (Fuentes *et al.*, 2006).

La quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) fue descrita por primera vez en sus aspectos botánicos por Willdenow en 1778, como una especie nativa de Sudamérica, cuyo centro de origen según Buskasov se encuentra en los Andes de Bolivia y Perú (Cárdenas, 1944). Esto fue corroborado por Gandarillas (1979), quien indica que su área de dispersión geográfica es bastante amplia, no solo por su importancia social y económica, sino porque allí se encuentran la mayor diversidad de ecotipos tanto cultivados como silvestres.



Estudios arqueobotánicos realizados por Bollaerd y Latcham, citados por **Cárdenas (1944)**, indicaron el hallazgo de semillas de quínoa en las tumbas indígenas de Tarapacá, Calama, Tiltel y Quillagua, demostrando este hecho que su cultivo es de tiempo muy remoto. Según **Jacobsen (2003)**, la quínoa es uno de los cultivos mas antiguos de la región Andina, con aproximadamente 7000 años de cultivo, en cuya domesticación y conservación han participado grandes culturas como la Tiahuanacota y la Incaica.

Además, la quínoa fue ampliamente cultivada en la región Andina por culturas precolombinas y sus granos han sido utilizados en la dieta de los pobladores tanto de valles interandinos, zonas mas altas (superiores a 3500 msnm), frías (temperaturas promedio de 12°C) y áridas (350 mm de precipitación promedio), como en el altiplano. A pesar de ser una especie completamente domesticada, los frutos aun contienen saponina, por lo que su extracción es necesaria antes de poder consumirlos (**Mujica, 1992; Heisser y Nelson, 1974**).

La quínoa puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centro de origen de amplia distribución y diversificación múltiple, considerándose las orillas del Lago Titicaca como la zona de mayor diversidad y variación genética (**Mujica, 1992**). Según **Lescano (1994)**, la quínoa esta distribuida en toda la región andina, desde Colombia (Pasto) hasta el norte de Argentina (Jujuy y Salta) y Chile (Antofagasta), y se ha encontrado un grupo de quínoas a nivel del mar en la Región de Concepción.

De acuerdo con su descripción taxonómica, es una planta anual, dicotiledónea, usualmente herbácea, que alcanza una altura de 0.2 a 3.0 metros. Las plantas pueden presentar diversos colores que van desde verde, morado a rojo y colores intermedios

entre estos. El tallo principal puede ser ramificado o no, es de sección circular en la zona cercana a la raíz, transformándose en angular a la altura de las ramas y hojas. Es mas frecuente el hábito ramificado en las razas cultivadas en los valles interandinos del sur del Perú y Bolivia, en cambio el hábito simple se observa en pocas razas cultivadas en el altiplano y en una buena parte de las razas del centro y norte del Perú y Ecuador (**Gandarillas, 1968; Tapia, 1990; Mujica, 1992**).

Con respecto a sus hojas, son de carácter polimórfico en una sola planta. Su color va desde el verde hasta el rojo, pasando por el amarillo y el violeta. Son dentadas en el borde pudiendo tener hasta 43 dientes. Contienen además gránulos en su superficie dándoles la apariencia de estar cubiertas de arenilla. Estos gránulos contienen células ricas en oxalato de calcio y son capaces de retener una película de agua, lo que aumenta la humedad relativa de la atmósfera que rodea a la hoja y, consecuentemente, disminuye la transpiración (**Tapia, 1990; Dizes y Bonifacio, 1992; Rojas, 2003**).

Por otra parte, su inflorescencia es racimosa y se denomina panoja por tener un eje principal mas desarrollado, del cual se originan los ejes secundarios y en algunos casos terciarios. Fue **Cárdenas (1944)** quien agrupó por primera vez a la quínoa por su forma de panoja, en amarantiforme, glomerulada e intermedia (Figura 3), y designó el nombre amarantiforme por el parecido que tiene con la inflorescencia del género *Amaranthus*. En cambio, las flores son muy pequeñas y densas, lo cual hacen difícil la emasculación. Se ubican en grupos formando glomérulos, son sésiles, de la misma coloración de los sépalos y pueden ser hermafroditas, pistiladas o androestériles.

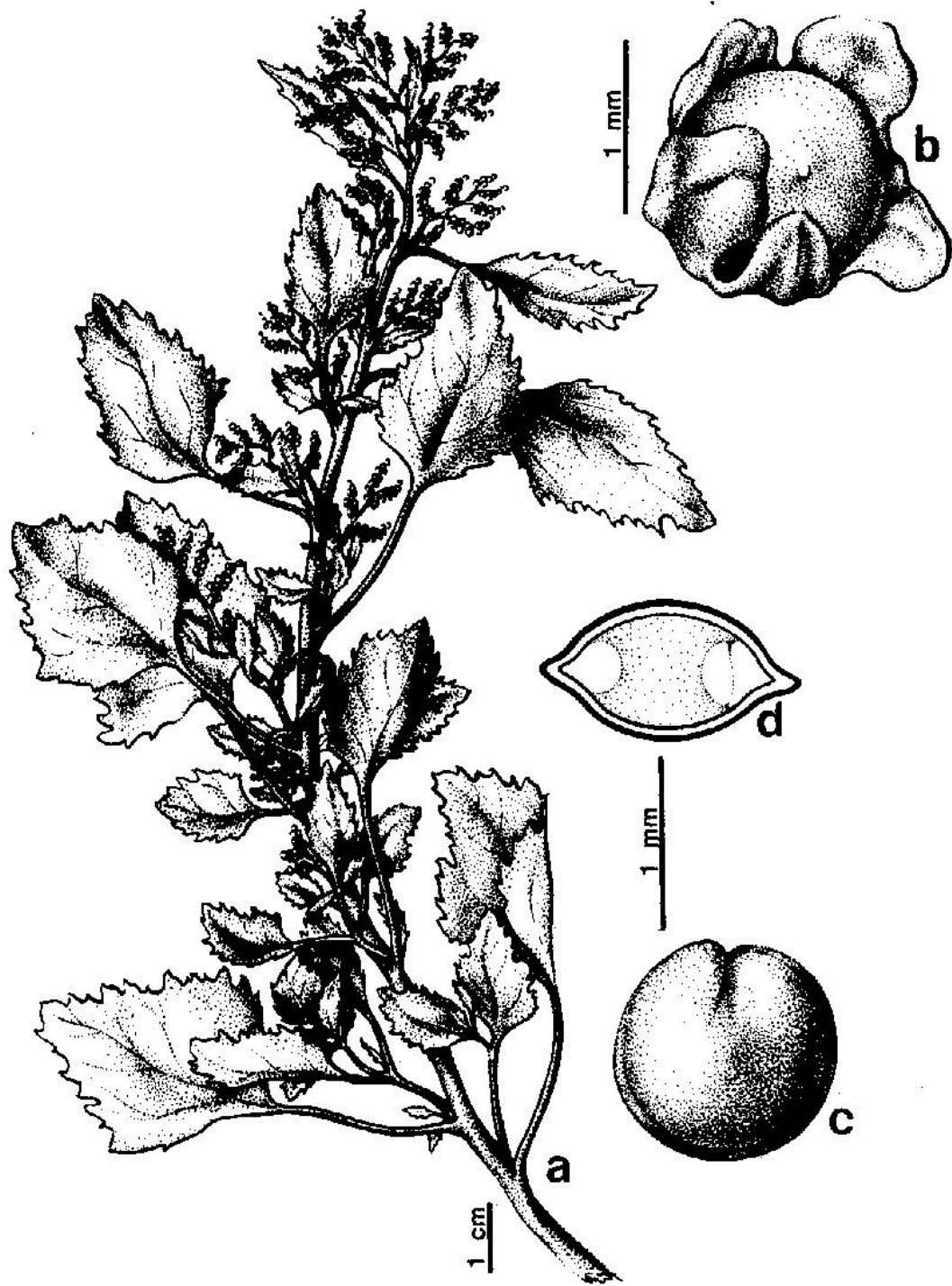
En lo que respecta al fruto, es un aquenio indehiscente que contiene un grano que puede alcanzar hasta 2.66 mm de diámetro de acuerdo a la variedad (**Rojas, 2003**).

Según **Tapia (1990)**, el perigonio cubre a la semilla y se desprende con facilidad al frotarlo (Figura 4). El episperma que envuelve al grano está compuesto por cuatro capas. La externa determina el color de la semilla, es de superficie rugosa, quebradiza, se desprende fácilmente con agua, y contiene a la saponina.



**Figura 3.** *Chenopodium quinoa* Willd. Izquierda) forma de panoja amarantiforme; derecha) forma de panoja glomerulada.

Por otra parte, las plantas silvestres de quínoa, las cuales tienen una distribución mundial, son aquellas que se han desarrollado sin intervención del hombre, y poseen valiosos genes que se constituyen en un potencial genético que puede ser aprovechado en el futuro. Algunos taxones y poblaciones se caracterizan por tolerar y resistir el ataque de insectos y enfermedades, de heladas y sequías; además poseen características favorables en cuanto al valor nutritivo y duración del ciclo de producción (**Rojas et al., 2008; Del Castillo et al., 2007**).



**Figura 4.** *Chenopodium quinoa* Willd. a) Habito; b) flor; c) semilla; d) corte de semilla.

### **2.2.2. Cultivo y Producción**

La situación de la producción y distribución de alimentos en el planeta presenta desafíos de gran magnitud a los cuatro pilares de la seguridad alimentaria: disponibilidad, acceso, consumo y utilización biológica. En este contexto, la quínoa se constituye como un cultivo estratégico para contribuir a la seguridad y soberanía alimentaria debido a su calidad nutritiva, su amplia variabilidad genética, su adaptabilidad y su bajo costo de producción. Por ello, el cultivo de quínoa representa una alternativa para que los países que tienen limitaciones en la producción de alimentos, y por lo tanto se ven obligados a importarlos o recibir ayuda alimentaria, puedan producir su propio alimento.

La quínoa es uno de los pocos cultivos que se desarrolla sin muchos inconvenientes en las condiciones extremas de clima y suelos. La gran adaptación a las variaciones climáticas y su eficiente uso de agua convierten a la quínoa en una excelente alternativa de cultivo frente al cambio climático que está alterando el calendario agrícola y provocando temperaturas cada vez más extremas. El Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal de Bolivia (INIAF) ha clasificado a la quínoa entre las 21 semillas más resistentes al cambio climático junto con el haba, maíz, amaranto, etc.

A continuación, se describe el manejo y producción orgánica del cultivo de quínoa tanto en su sistema tradicional como el mecanizado en Bolivia.

Respecto a la situación de los sistemas de producción implementados en el país, por un lado en el Altiplano Sur, el sistema mecanizado (95%) prácticamente está reemplazando el sistema tradicional (5%), mientras que en los Altiplanos Centro y

Norte, el cultivo sigue en rotación a la papa y se aprovecha la preparación del suelo del año anterior sea mecanizado o tradicional, aunque por el precio de la quínoa se esta habilitando y preparando suelos bajo el sistema mecanizado.

El sistema tradicional consiste en la preparación del suelo en forma manual con tracción humana que se realiza con una herramienta denominada taquiza, Liukána o Tankána, que consiste en la remoción total o parcial del suelo en forma superficial, dependiendo de la zona de producción. En el caso del Altiplano Sur se realizan montículos de forma cónica, con un diámetro de 25 a 30 cm y una altura de 15 a 20 cm, aunque este sistema generalmente se los realiza en laderas (**Cossio, 2005**).

El sistema mecanizado consiste en la preparación del suelo con el empleo de la tracción motriz con el uso del arado de disco. Según **Cossio (2005)** en el Altiplano Sur su uso es limitado en terrenos con pendiente, con el uso del tractor agrícola se amplió la frontera agrícola a terrenos planos (Pampa), donde se realizó la habilitación de terrenos vírgenes o purumas con topografía irregular que por la naturaleza del clima son suelos frágiles (sin estructura) y con una baja capacidad de retención de agua (suelo franco arenoso).

Cabe resaltar que la siembra es una de las actividades de mayor importancia durante este proceso, ya que de esta labor depende la emergencia de plántulas que tendrá incidencia en la densidad de las mismas por superficie cultivada y sobre el rendimiento a obtener. La siembra en el cultivo de la quínoa se realiza en diferentes épocas, dependiendo del lugar a sembrarse, características de la variedad y humedad del suelo, factores importantes que determinan el tipo de siembra manual o mecánica.

La siembra tradicional es una labor que aun se práctica tanto en el Altiplano como en los Valles Interandinos. En el Altiplano Centro y Norte la siembra se realiza en surcos y la distribución de semilla se realiza a chorro continuo o al voleo, por lo general la distancia entre surco es de 50 cm. En el Altiplano Sur luego de abrir el hoyo con la “taquiza” hasta alcanzar tierra húmeda se deposita la semilla e inmediatamente se cubre con tierra con un espesor que varía entre 4 a 10 cm, donde la distancia entre hoyo y hoyo varía de 1 a 1.20 m. y entre los surcos también varía de 1 a 1.20 m. En ambos sistemas de siembra, la cantidad de semilla puede variar entre 6 a 8 kg/ha.

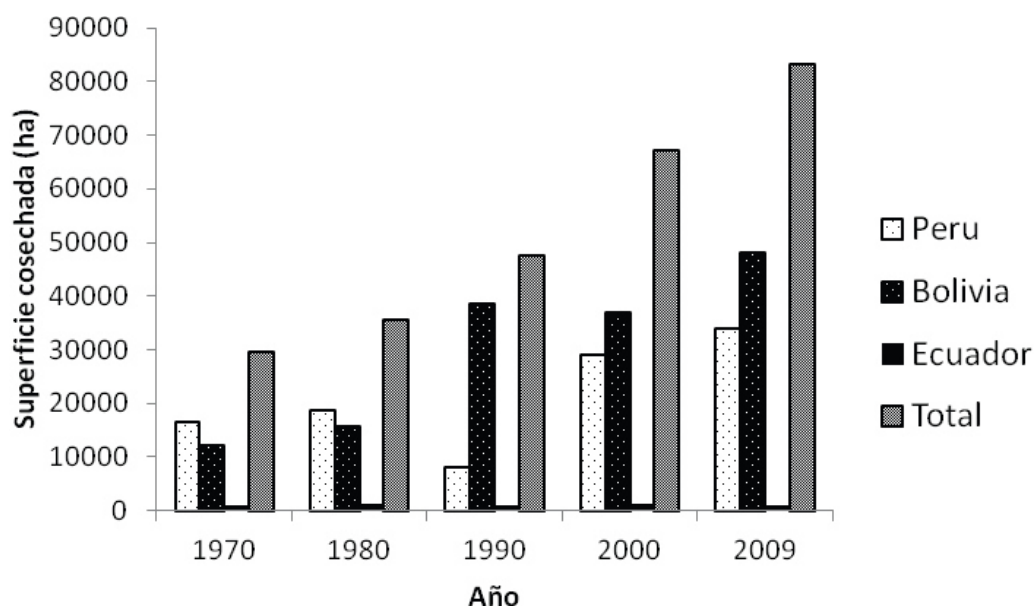
La siembra mecanizada en el Altiplano Sur alcanza por lo menos el 70% de las familias y se realiza con la sembradora Satiri. La sembradora tiene dos surcadoras con sus tolvas para la alimentación de la semilla; la apertura de las surcadoras se puede regular a una distancia entre 0.8 a 1 m.; y en los surcos la semilla se deposita por golpes, también a una distancia de 0.80 a 1 m. Este sistema de siembra es eficiente en terrenos nivelados y uniformes, producto de un buen barbecho. De igual forma, se debe aplicar en suelos cuya humedad debe estar a una profundidad de 10 a 15 cm (Aroni, 2005).

La distribución geográfica de la producción mundial de quínoa se presenta en la Figura 5, donde se puede observar que los países con mayor producción son Bolivia, Perú y Ecuador. Sin embargo, producto de más de veinte años de trabajo que se viene desarrollando en países potenciales de Europa, Asia, África, Australia, Norte América y de la región, la producción de la quínoa se encuentra en franco proceso de expansión hacia diferentes espacios geográficos del planeta por sus extraordinarias características de adaptación y adaptabilidad.



**Figura 5.** Distribución geográfica de la producción mundial de quínoa

Las mayores superficies de producción de quínoa en la zona Andina se encuentran en Bolivia, Perú y Ecuador. A continuación, en la Figura 6 y 7, se pueden observar datos referenciales de la superficie y los volúmenes de producción del cultivo para estos tres países de acuerdo a la base de datos de la **FAO (2011)**.



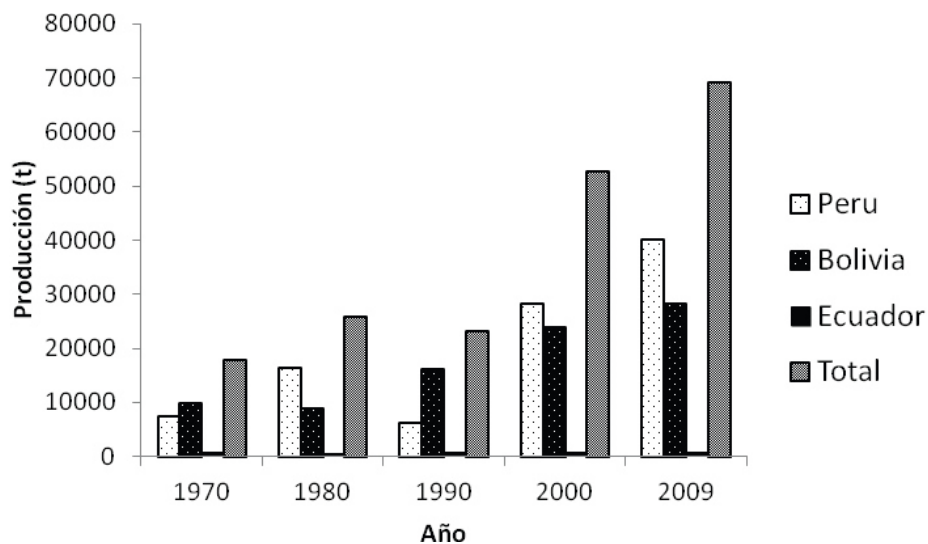
**Figura 6.** Superficie cosechada de quínoa en tres países Andinos en cinco años referenciales.

Fuente: FAOSTAT (2011)



Para inicios de los 90's se observa un importante incremento de la superficie producida en Bolivia: de 15000 ha en 1980 a casi 40000 ha en 1990, debido a la implementación de la labranza mecanizada de los suelos alrededor del Salar de Uyuni (**Laguna, 2003**). En ese mismo periodo, la superficie producida con este cultivo en el Perú se ve mermada debido a los efectos del Fenomeno del Niño que reportó pérdidas de hasta 80% de los cultivos de quínoa en Puno de la campaña agrícola 1982-1983 (**Zavala y Caputo, 1985; Agrodata y CEPES, 1997**) efectos que se vieron también en menor proporción en el Ecuador. En el año 2000, las superficies de producción de quínoa a nivel Andino aumentan a mas de 67000 ha, con un notorio incremento de mas de 20000 ha en la superficie de producción del Perú y una estabilización de las superficies de cultivo en Bolivia y Ecuador (**Laguna, 2003**).

Por otra parte, hasta el año 1980, la producción de quínoa en la región Andina supera las 25000 toneladas proviniendo estos volúmenes de producción de los dos países que mas lo cultivan (Bolivia y Perú) (Figura #).



**Figura 7.** Producción de quínoa en tres países Andinos en cinco años referenciales.

Fuente: FAOSTAT (2011)

En 1990 se llega a observar en la producción los efectos del Fenomeno del Niño, citados anteriormente, en la cual la producción del Perú se reduce en un 60% comparativamente con la producción del año 1980.

En el año 2000, la producción de la región andina se duplica comparativamente a los años 1980 y 1990 y pasa a superar las 50000 toneladas debido a un notorio incremento de la producción de Perú y Bolivia (350% y 48% mas de producción que en el año 1990, respectivamente) que responde a la demanda de los nuevos mercados.

Para el año 2009, la producción de la región Andina se acerca las 70000 toneladas con casi 40000 toneladas producidas por el Perú, 28000 toneladas por Bolivia y 746 toneladas por Ecuador.

Estos datos reflejan que los principales países productores de quínoa en la región andina y en el mundo son Perú y Bolivia; hasta el año 2008 la producción de ambos países representaba el 92% de la quínoa producida en el mundo (**Suca Apaza y Suca Apaza, 2010**).

### **2.2.3. Composición química de la semilla**

Los beneficios del cultivo de quínoa están dados por su alto valor nutricional. El contenido de proteína varía entre 13-22%, dependiendo de la variedad. Debido al elevado contenido de aminoácidos esenciales en su proteína, la quínoa es considerada como el único alimento del reino vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, que se encuentran extremadamente cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO (1985).

### **2.2.3.1. Composición lipídica**

Resulta importante destacar la cantidad relativamente alta de aceite en la quínoa, lo que la convierte en una fuente potencial para la extracción de este.

**Wood *et al.*, (1993)** encontraron que el 11% de los ácidos grasos totales de la quínoa eran saturados, siendo el ácido palmítico el predominante. Los ácidos linoleico (omega 6), oleico (omega 9) y alfa-linolénico (omega 3) eran los ácidos insaturados predominantes con concentraciones de 52,3, 23.0 y 8.1% de ácidos grasos totales, respectivamente. Ellos encontraron también aproximadamente 2% de ácido erúcido.

La quínoa ayuda a reducir el colesterol LDL (o colesterol malo) del organismo y elevar el colesterol (HDL) gracias a su contenido en ácidos grasos omega 3 y omega 6. En las últimas décadas los ácidos grasos insaturados han cobrado gran importancia por la actividad benéfica para el organismo que se les atribuye, al mantener la fluidez de los lípidos de las membranas.

### **2.2.3.2. Fibra**

La quínoa posee un alto porcentaje de fibra dietética total (FDT), lo cual la convierte en un alimento ideal que actúa como un depurador del cuerpo, logrando eliminar toxinas y residuos que puedan dañar el organismo. Produce sensación de saciedad, además de tener la propiedad de absorber agua y permanecer más tiempo en el estómago.

### **2.2.3.3. Proteínas**

De acuerdo a lo descrito por la FAO/OMS/UNU (1985), la calidad nutricional de un producto depende tanto de la cantidad como de la calidad de sus nutrientes. Entre el 16 y el 20% del peso de una semilla de quínoa lo constituyen proteínas de alto valor biológico, entre ellas todos los aminoácidos, incluidos los esenciales. Los valores del contenido de aminoácidos en la proteína de los granos de quínoa cubren los requerimientos de aminoácidos recomendados para niños en edad preescolar, escolar y adultos. No obstante, la importancia de las proteínas de la quínoa radica en la calidad. Las proteínas de quínoa son principalmente del tipo albumina y globulina. Estas, tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición aminoacídica de la caseína.

Cien gramos de quínoa contienen casi el quintuple de lisina, mas del doble de isoleucina, fenilalanina, treonina y valina, y cantidades muy superiores de leucina en comparación con 100 gramos de trigo. Además supera a este –en algunos casos por el triple- en las cantidades de histidina, arginina, alanina y glicina, además de contener aminoácidos no presentes en el trigo como la prolina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la cisteína, la serina y la tirosina.

Ademas, la excepcional riqueza en aminoácidos que tiene la quínoa le confiere propiedades terapéuticas muy interesantes. Y ello porque la biodisponibilidad de la lisina de la quínoa –el aminoácido esencial mas abundante en sus semillas-, es muy alta mientras en el trigo, el arroz, la avena, el mijo o el sésamo es notablemente mas baja. Este aminoácido que mejora la función inmunitaria al colaborar en la formación de

anticuerpos, favorece la función gástrica, colabora en la reparación celular, participa en el metabolismo de los ácidos grasos, ayuda al transporte y absorción del calcio e, incluso, parece retardar o impedir –junto con la vitamina C- las metástasis cancerosas, por mencionar solo algunas de sus numerosas actividades terapéuticas.

En cuanto a la isoleucina, la leucina y la valina, participan juntos en la producción de energía muscular, mejoran los trastornos neuromusculares, previenen el daño hepático y permiten mantener en equilibrio los niveles de azúcar en sangre, entre otras funciones. Por lo que respecta a la metionina se sabe que el hígado la utiliza para producir s-adenosi-metionina, una sustancia especialmente eficaz para tratar enfermedades hepáticas, depresión, osteoartritis, trastornos cerebrales, fibromialgia y fatiga crónica, entre otras dolencias. Además actúa como potente agente detoxificador que disminuye de forma considerable los niveles de metales pesados en el organismo y ejerce una importante protección frente a los radicales libres.

La quínoa también contiene cantidades interesantes de fenilalanina (un estimulante cerebral y elemento principal de los neurotransmisores que promueven el estado de alerta y el alivio del dolor y de la depresión), de treonina (que interviene en las labores de desintoxicación del hígado, participa en la formación de colágeno y elastina, y facilita la absorción de otros nutrientes) y triptófano (precursor inmediato del neurotransmisor serotonina por lo que se utiliza con éxito en casos de depresión, estrés, ansiedad, insomnio y conducta compulsiva).

Por lo que respecta a la digestibilidad de la proteína o biodisponibilidad de los aminoácidos de la quínoa, esta varía según la variedad y el tratamiento a que son sometidas. **Lopez de Romana et al. (1981)** encontraron que la digestibilidad de las

semillas de quínoa es el factor limitante en su utilización proteica y energética, y que la molienda mejora significativamente la digestibilidad de grasas y carbohidratos.

#### **2.2.3.4. Azúcares**

Los carbohidratos de las semillas de quínoa contienen entre un 58 y 68% de almidón y un 5% de azúcares, lo que la convierte en una fuente óptima de energía que se libera en el organismo de forma lenta por su importante cantidad de fibra.

El almidón es el carbohidrato más importante en todos los cereales. Constituye aproximadamente del 60 al 70% de la materia seca. En la quínoa, el contenido de almidón es de 58 a 64% (Bruin, 1964). El almidón en las plantas se encuentra en la forma de gránulos. **Ahamed et al. (1998)** mencionan que el almidón de quínoa tiene una excelente estabilidad frente al congelamiento y la retrogradación. Estos almidones podrían ofrecer una alternativa interesante para sustituir almidones modificados químicamente (**Repo-Carrasco et al., 2003**).

#### **2.2.3.5. Polifenoles**

**Zhu et al. (2001)** han aislado seis glicosidos de flavonol de la semilla de quínoa. Estos compuestos exhiben capacidad antioxidante, lo que sugiere que estas semillas pueden servir como una buena fuente de agentes eliminadores de radicales libres. **Gorinstein et al. (2008)** encontraron taninos en la semilla de quínoa, los cuales mostraron tener inclusive mayor actividad antioxidante que algunos cereales reportados.

## 2.3. *Salvia hispanica* L.

### 2.3.1 Historia, Origen y Botánica

De acuerdo a la descripción y clasificación taxonómica de *Salvia hispanica* L. realizada por Linneaus (1753), la especie de nombre común chía se clasifica en el género *Salvia* (Figura 8). Este taxón posee alrededor de 900 a 1000 especies y conforma uno de los mayores géneros de la familia Lamiaceae, la cual entre sus características mas distintivas sobresale poseer cuatro frutos libres o tetranuculas, lo que la diferencia de las familias cercanas (Rosua y Blanca, 1986; Sepehry *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2004; Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006).



**Figura 8.** *Salvia hispanica* L. inflorescencia.

En el centro-sur de México y norte de Guatemala, se establece el origen de la especie *Salvia hispanica* L. (**Beltran-Orozco y Romero, 2003; Ayerza y Coates, 2004; Capitani et al., 2012**).

En el género *Salvia*, de acuerdo a la descripción realizada por **Ramamoorthy (1985)**, se encuentran arbustos o plantas herbáceas, a menudo aromáticos; con hojas opuestas o a veces verticiladas; flores por lo general en verticilos formando espigas; brácteas frecuentemente grandes, deciduas o persistentes; cáliz bilabiado, labio superior usualmente entero, labio inferior bilobado; corola conspicua bilabiada, labio superior derecho o arqueado, labio inferior trilobado; 2 estambres; ovario profundo, estilo bifido.

Existe evidencia arqueobotánica de que la chia fue usada cerca de 3 500 años antes de la era cristiana para alimentación humana en Mesoamérica, región del planeta probablemente cuna de la agricultura y fitodomesticación (**Hernández y Herrerias, 2004; Casas y Caballero, 1995; Raya-Pérez et al., 2010**). Entre los años 2600 y 2000 a.C., las civilizaciones Tolteca y Teotihuacana cultivaban chía antes de la llegada del imperio Azteca al centro de México y durante la época del 1500 a 900 a.C. la chía ya era un pilar fundamental en la alimentación de varias civilizaciones Mesoamericanas del valle de México (**Beltran-Orozco y Romero, 2003; Coates, 2011**).

Se tiene el conocimiento de que los aztecas la emplearon como alimento (**Ayerza y Coates, 2004**), medicina, pintura y también de manera religiosa (**Alvarado, 2011**). Como uso alternativo se ha descrito que fue moneda de cambio y tributo, ya que cada año las ciudades conquistadas pagaban desde 5 a 15000 toneladas de chia a la ciudad de Tenochtitlan, capital del imperio Azteca (**Ortíz de Montellano, 1993; Ayerza y Coates, 2004**).



En cuanto al uso alimentario, la chia fue un ingrediente básico para platos y bebidas de consumo diario para los aztecas. Un alimento cotidiano para ellos era la mezcla de semillas tostadas de chíá y amaranto, que formaban una masa llamada “tzoalli” (Ayerza y Coates, 2006).

De acuerdo con **Gutierrez-Rosatti (2004)**, la chia es una planta herbácea que sobrepasa el metro de altura; posee un tallo cuadrangular y pubescente; presenta hojas simples, opuestas y enteras; posee flores hermafroditas ubicadas en inflorescencias y su fruto es una clusa, que comercialmente se denomina semilla.

El tallo posee un diámetro promedio de 2 cm, es sufrútice, ramoso, ramificado, aromático, cuadrangular y pubescente. El indumento es abundante, posee tricomas glandulares y no glandulares.

Con respecto a las hojas, son simples, opuestas, enteras y de lámina oval-elíptica, discolora, base cuneada a subcordada, ápice agudo, margen dentado-aserrado, pinnadas, con nervaduras prominentes en el envés, pubescentes, de 8 a 12 cm de largo y 4 a 7 cm de ancho; su pecíolo es corto, pubescente, mide 1 a 3 cm en parte superior de la planta y 5 a 7 cm en las ramificaciones inferiores (**Di Sapio et al., 2012**).

Las flores se reúnen en grupos de seis o más en verticilos sobre el raquis de una inflorescencia denominada verticilastro. La flor posee pedúnculo; cáliz persistente, pubescente y bilabiado; corola monopétala, bilabiada, de color morado o azul; 2 estambres que están unidos por un conectivo que se articula a filamentos cortos que se insertan en la corola; ovario súpero, bicarpelar y tetralocular, en la base se encuentra un disco nectarífero; estilo glabro, glanduloso en la base y su estigma tiene dos

ramificaciones; las anteras y el estigma están cubiertos y protegidos por la gálea (**Ramamoorthy y Martínez, citado por Hernández-Gomez et al., 2008**).

El fruto es un carcérulo que produce 1 a 4 mericarpos indehiscentes llamados núculas o clusas. Son de color pardo grisáceas, con abundantes manchas de contornos irregulares de color castaño oscuro, en menor proporción se observan de color blanquecino con la inserción basal y los límites de las areolas de color castaño claro.

Por otra parte, cada semilla se inserta por clusa. Es horizontal, albuminosa, de contorno oblongo-elíptico, forma levemente navicular, el extremo radicular es angosto y cotiledonal ancho; la superficie es opaca, reticulada, de color amarillo-ocre; sus dimensiones son 1.3 a 1.8 mm de largo y 1 a 1.2 mm de ancho (Figura 9). Al igual que la mayoría de las semillas, posee episperma o cubierta seminal, endosperma y embrión (**Di Sapia et al., 2012**).



**Figura 9.** *Salvia hispanica* L. Habito, inflorescencia y semilla.

### 2.3.2. Cultivo y Producción

La chia originaria e históricamente ha sido cultivada en climas tropicales a subtropicales (**Lobo et al., 2011; Coates, 2011**). De acuerdo a la **FAO (2010)**, plantas de origen tropical presentan daños severos cuando se exponen a temperaturas bajo 0°C, además el género *Salvia* es descrito como sensible a temperaturas de congelación.

En cuanto a los requerimientos hídricos de *Salvia hispanica* L. son de 250 a 300 mm de precipitación (**Rocca, citado por Pozo 2010**). En relación a la capacidad de la chía a tolerar el déficit hídrico, **Weber et al. (1991)** señalan que la chía es una especie tolerante al déficit hídrico. Respecto a la salinidad, la chia es factible cultivarla bajo condiciones de riego con agua que presenta niveles de salinidad de 3.0 ds/m, sin embargo, este afecta negativamente la producción de aceite en un 20%, pero no se afecta estadísticamente la proporción de ácido alfa-linolénico en comparación con condiciones de agua no salina (**Heuer et al., 2002**).

La época recomendable para la siembra es en abril, la cual permite un desarrollo adecuado de las plantas las cuales pueden alcanzar de 50 a 80 cm de altura. Las siembras más tardías propician que el periodo vegetativo sea menor, ocurriendo más rápidamente la floración y fructificación de las plantas de manera que no alcanzan un tamaño adecuado y, por ende, afectan negativamente a los rendimientos (**Miranda, 2012**).

En la actualidad, la chia es cultivada en los estados de Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Veracruz, San Luis Potosí, Chiapas y México (**Benavides et al., 2010**); pequeñas parcelas en Gran Bretaña (**Pozo, 2010**); provincias de Salta, Tucumán, Jujuy y Catamarca, Argentina (**Lobo, 2012**); ciudad de Santa Cruz, Bolivia; ciudades de

Andahuaylas y Huánuco, Perú; Australia; Guatemala (**Jamboonsri, 2012**); ciudad de Quito, Ecuador (**PROECUADOR, 2014**); estados de Florida, Nueva York y Texas, Estados Unidos (**USDA, 2013**); Medellín, Colombia (**Idarriaga et al., 2011**); Belice; Costa Rica; Panamá; departamentos de Esteli, Matagalpa, Jinotega, Nueva Segovia y Madriz, Nicaragua; República Dominicana; República Democrática del Congo; Kenia; Tanzania; Angola; Zambia; Mozambique; India; Sri Lanka; Tailandia; Camboya; Vietnam; Filipinas; Malasia; Indonesia; Papúa Nueva Guinea; Brasil y Paraguay (**PURECHIA, 2013**).

Los rendimientos del cultivo de chia son muy variables. Los factores ambientales, genotipos poco adaptados a la zona de producción y poco conocimiento sobre los manejos agronómicos orientados a maximizar la producción pueden influir en la obtención de grano (**Coates, 2011; Ayerza y Coates, 2006**).

En México, hace apenas algunos años se retomó el cultivo en los municipios Acatic, Cuquío y Zapotlanejo, en Jalisco, donde en los últimos años se obtuvo el 99% de la producción nacional, misma que en el 2011 llegó a 3449 toneladas cosechadas en 2720 hectáreas, de acuerdo a la información proporcionada por Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, en el 2013. Cabe resaltar que en el estado de Jalisco se logran rendimientos de 1200 kg/ha, en zonas con 450 mm de precipitación, dosis de siembra de 4 kg/ha y una fertilización de 70 kg de Nitrógeno y 46 kg de Fósforo por hectárea (**Lamas, 2013**).

Esta información respalda a la chia como un cultivo potencialmente apto para ser explotado, tanto por sus beneficios económicos, como por sus ventajas nutricionales que lo avalan como una importante área de oportunidad agroalimentaria.

### **2.3.3. Composición química de la semilla**

La chia es conocida principalmente como fuente de ácidos grasos omega 3, sin embargo, también presenta otros componentes importantes para la nutrición humana (**Capitani et al., 2012**). Las semillas de chía poseen cantidades significativamente mayores de proteína, fibra, y grasas, que otros cultivos de importancia económica y alimentaria como el arroz, trigo y maíz (**Ayerza y Coates, 2006**).

#### **2.3.3.1. Composición lipídica**

La chía posee entre un 32-39% de aceite (**Alonso-Calderón et al., 2013**). Dentro del total de lípidos, la proporción de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, se encuentran aproximadamente en 9.7, 6.5 y 82.8, respectivamente. De los ácidos grasos poliinsaturados, el 22.9% es ácido linoleico, de la serie omega 6 y el 77.1% es ácido alfa-linolénico de la serie omega 3 (**Ayerza y Coates, 2006**).

La composición lipídica de la semilla de chía se caracteriza por poseer la mayor concentración de ácido alfa-linolénico (ALA) conocida en la actualidad en un organismo vegetal, con un valor que puede alcanzar el 63.8% del total del aceite presente en la semilla (**Ayerza y Coates, 2006**). Cabe citar que el omega 3 de origen marino corresponde a metabolitos del ácido alfa-linolénico, los cuales son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de acuerdo con **Valenzuela et al. (2011)**.

En relación a los beneficios que tiene el consumo de ácidos grasos poliinsaturados para la salud, actualmente existe una vasta evidencia científica que menciona a los ácidos grasos omega 3 como un importante factor en la prevención de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, mentales, desordenes autoinmunes, y cáncer (**Simopoulos, 1991; Simopoulos, 2008; Yan *et al.*, 2013; Calder, 2006; Calder, 2013; Bourre, 2007; Mossaheb *et al.*, 2013**).

Sin embargo, **Erazo *et al.* (2014)** describe que existe un aumento en los riesgos de padecer cáncer de próstata en personas con una alta ingesta de ALA. Además, en aquellas personas que ya poseían cáncer, este se volvió más agresivo cuando el consumo de ALA aumento.

### **2.3.3.2. Fibra**

La chia es una excelente fuente de fibra, si se compara con especies como soya y maíz (**Beltran-Orozco *et al.*, 2005**). Las características de la fibra dietaria de la semilla de chia son baja capacidad de intercambio cationico, características relevantes debido a que evitara la indisponibilidad de ciertos minerales que son requeridos por el cuerpo humano, y una gran capacidad de retención de agua, ya que la semilla de chia absorbe 16 veces más su peso en agua que la semilla de linaza. De acuerdo al trabajo de **Muñoz (2012)**, tan solo el mucilago de la semilla de chíá es capaz de absorber 27 veces su peso en agua, sin embargo, cuando se determina la absorción de agua por la semilla entera, este valor decrece a 12 veces.

Respecto a la fibra soluble e insoluble de la fibra dietaria total de la chía, esta se encuentra en una proporción aproximada de 6.16 y 32.8 g por cada 100 g de fibra, respectivamente (**Beltran-Orozco et al., 2005**).

La ingesta de fibra tiene reconocidos efectos en la salud de las personas, los suplementos con fibra son recomendados en el tratamiento del síndrome del colón irritable (**Singh et al., 2008**). Además, los productos ricos en fibra colaboran a reducir el nivel plasmático de colesterol LDL y glucosa (**Aller et al., 2004**), ambos factores asociados con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (**Islam et al., 2010**).

### **2.3.3.3. Proteínas**

Con respecto a las proteínas de chia, esta tiene entre un 19 y 23% (**Beltran-Orozco y Romero, 2003**) y posee una balanceada cantidad de aminoácidos esenciales (**Monroy-Torres et al., 2008**). Hasta el momento no se han encontrado factores nutricionales limitantes en la proteína de la chia, por lo tanto podría ser una alternativa para ser suministrada en la dieta humana. Un punto importante y contrario a otros cultivos de cereales, es la ausencia de gluten, una glicoproteína causante de la enfermedad celiaca (**Ayerza y Coates, 2006**).

A pesar del notable perfil de aminoácidos, **Monroy-Torres et al. (2008)** señalan que el contenido proteico de la chia posee una pobre digestibilidad (79.8%), lo cual se traduce en que solamente una pequeña parte de la proteína consumida puede ser absorbida y empleada por el organismo.

#### **2.3.3.4. Azúcares**

Una característica sobresaliente de la semilla es que cuando entra en contacto con un medio acuoso, segrega un polisacárido mucilaginoso que rodea la semilla. Se ha informado de que el consumo de este mucilago ayuda a la digestión y que, junto con la semilla, constituye una fuente de alimento nutritiva (**Salgado-Cruz *et al.*, 2005**).

#### **2.3.3.5. Polifenoles**

La chía contiene varios compuestos con potente actividad antioxidante, entre los más importantes se encuentran los compuestos fenólicos simples, como el ácido clorogénico, ácido cafeico, y los compuestos fenólicos complejos, donde se encuentran la quercitina, mirecitina y el kaempferol, también clasificados como flavonoides (**González *et al.*, 2010**). La importancia de estos compuestos es que actúan como conservante del aceite, por éste motivo las antiguas civilizaciones podían guardar la harina de chía por largos periodos sin que esta se enranciará (**Di Sapia *et al.*, 2008**). Al poseer una mínima oxidación, la chía ofrece un gran potencial para ser empleada en la industria alimentaria debido a que las otras fuentes de omega 3 suelen ser inestables y sufren una descomposición rápida por la ausencia de compuestos antioxidantes (**Ayerza y Coates, 2006**). En cuanto a los beneficios para la salud, estudios epidemiológicos indican que la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes puede prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (**Martínez-Flores *et al.*, 2002; García *et al.*, 2012; La Vecchia *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012**).



## 2.4. Aislados proteicos de origen vegetal

De acuerdo a lo descrito en el “Segundo Informe del Estado Mundial de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura”, publicado por la FAO en 2010, para el año 2050 será necesario producir el doble de alimentos que lo generado en el año 2000, pero esto ocurrirá con la misma cantidad de tierra y con menor cantidad de agua y de otros insumos, además de que el cambio climático será otro factor que deberá ser tomado en cuenta, ya que afectará el medio ambiente donde crecen los cultivos y planteará a los agricultores nuevos desafíos (FAO, 2010). Es por ello, que surge la necesidad de buscar nuevas fuentes de alimento o mejorar las ya existentes para tratar de contrarrestar dicha problemática.

Una alternativa interesante es el aprovechamiento de la gran cantidad de residuos agroindustriales ricos en proteínas que se generan a nivel mundial, dentro de los cuales se encuentran las harinas desengrasadas que proceden de la extracción del aceite de una amplia diversidad de semillas. Estos residuos suelen ser empleados para la alimentación del ganado, sin embargo representan uno de los reservorios proteicos con mayor potencial para la industria alimentaria. Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés en el aprovechamiento de estas proteínas y se han desarrollado procesos para la obtención y mejora de ellas mediante la producción de aislados proteicos.

De este modo, los aislados proteicos obtenidos a partir de recursos vegetales representan una fuente de ingredientes alimentarios de alta calidad, con contenidos proteicos entre el 80 y el 90%, los cuales pueden ser empleados para mejorar tanto la composición nutricional como las características funcionales de los alimentos.

### 2.4.1. Obtención de aislados proteicos

Diversas investigaciones se han realizado sobre la obtención de concentrados y aislados proteicos, así como de la evaluación y mejora de las propiedades funcionales, de una amplia gama de fuentes vegetales ricas en proteínas, lo cual ha conducido a un incremento en la producción y uso de ellas como ingredientes alimentarios. Entre las principales materias primas empleadas se encuentran las leguminosas, tales como el garbanzo y el haba, las oleaginosas, como el cacahuate y el girasol, además de subproductos de industrias extractoras de aceite, los cuales también han sido utilizados en la elaboración de muchas preparaciones alimenticias.

Como se menciona anteriormente, un aislado proteico es un material caracterizado por contener una riqueza entre un 80 y 90% de proteínas, partiendo del supuesto aislamiento del resto de los componentes no proteicos para su elaboración. Los componentes no proteicos, entre los cuales se encuentran los lípidos, la fibra, los hidratos de carbono y componentes menores (como azúcares solubles, sustancias minerales, componentes considerados antinutricionales como los polifenoles, saponinas, alcaloides, etc.), pueden interactuar con las proteínas durante el proceso de obtención de los aislados, afectando con ello la calidad del producto final.

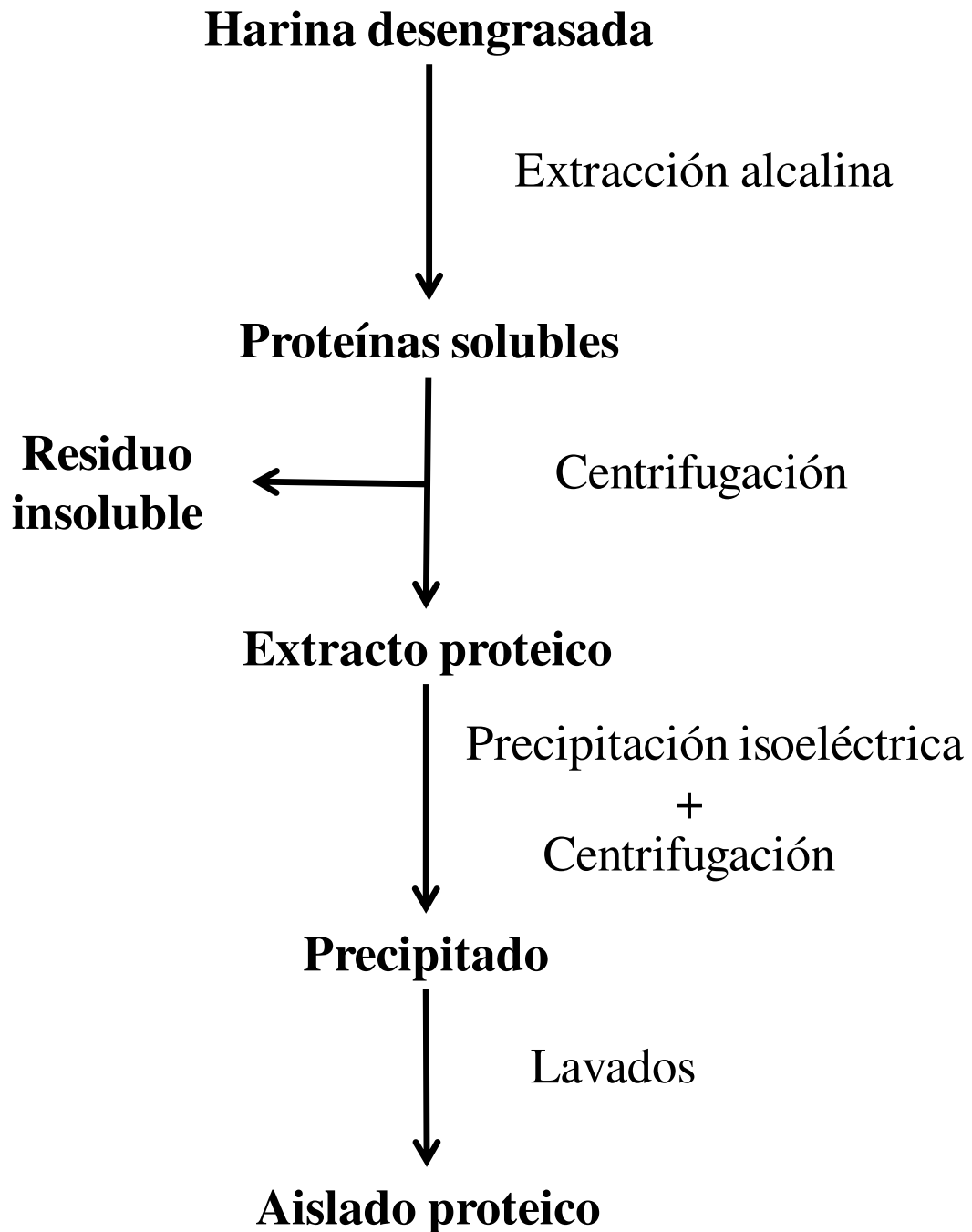
La asociación de los lípidos con las proteínas puede producirse durante la elaboración del aislado y suele verse favorecida por la desnaturalización de las proteínas durante el proceso, la cual ocasiona la exposición de los aminoácidos hidrofóbicos ocultos en la proteína nativa, lo que facilita la asociación entre las cadenas alifáticas de los lípidos y estos aminoácidos mediante uniones hidrofóbicas (**Hanssens *et al.*, 1985**).

Como consecuencia, los lípidos disminuyen la solubilidad de los aislados proteicos, influyen en las propiedades funcionales de las proteínas, disminuyen la digestibilidad proteica y pueden reducir la disponibilidad de aminoácidos como tirosina, lisina, histidina, metionina o triptófano (**Boatright y Hettiarachchy, 1995; Karleskind *et al.*, 1996; Sanchez-Vioque *et al.*, 1999**).

Por otra parte, el carácter antinutricional de la fibra respecto a la fracción proteica, contribuye a una pérdida endógena de proteínas al aumentar el volumen de la fracción no digerible y, por otro lado, afecta a la digestibilidad de ciertos aminoácidos individuales, principalmente lisina (**Baer *et al.*, 1997; De Lange *et al.*, 1998**).

En lo que respecta a los hidratos de carbono y los componentes menores, los primeros pueden reaccionar con las proteínas afectando al valor nutricional y funcional de las mismas (**Cheftel, 1989**), mientras que las principales reacciones que ocurren entre las proteínas y los componentes menores son las denominadas reacciones de Maillard. Un ejemplo de ello es el que ocurre con los azúcares solubles en etanol por su capacidad de reaccionar con ciertos aminoácidos de las proteínas ocasionando una disminución de la biodisponibilidad de algunos aminoácidos esenciales, especialmente la lisina (**Friedman, 1996**). Por otra parte, se ha observado que a pH alcalino los polifenoles se oxidan a quinonas, las cuales a su vez se polimerizan a pigmentos oscuros que disminuyen la calidad del aislado afectando a la disponibilidad de aminoácidos como triptófano, metionina o lisina (**Hurrel y Finot, 1984**). Otros efectos que producen las reacciones de Maillard son el oscurecimiento del material proteico (**Hofmann, 1998**), además de influir en ciertas propiedades funcionales de proteínas como la gelificación, debido a la formación de complejos proteínas-polifenoles (**Easa *et al.*, 1996**).

El proceso de obtención de los aislados proteicos consta de dos etapas (Figura 10).



**Figura 10.** Obtención de aislados proteicos a partir de harinas desengrasadas mediante extracción alcalina y precipitación isoelectrica

**1) Etapa de extracción (en medio alcalino).** Esta etapa resulta sumamente importante para definir la eficiencia del proceso de recuperación proteica y consiste en generar las condiciones ideales para maximizar la solubilidad de las proteínas. Inicialmente, las proteínas se solubilizan a pH alcalino para separarlas del resto de los compuestos no solubles. Durante esta etapa los principales factores que intervienen son el pH del medio, la concentración del sustrato (proporción solvente/proteína) y la duración de las extracciones. Pese a que una amplia gama de proteínas vegetales son solubles a pH próximo a la neutralidad, es preferible extraerlas a pH alcalino para favorecer la solubilización de las proteínas que pueden desnaturalizarse durante la extracción del aceite (**Zhou *et al.*, 1990**). Como agente alcalino suele utilizarse NaOH para obtener y mantener el pH básico necesario para la solubilización de las proteínas. Sin embargo, es posible usar además otras bases como sulfito sódico, el cual es empleado como agente reductor para prevenir la oxidación de sustancias fenólicas durante la obtención de aislados y de este modo evitar la coloración de los mismos (**Blaicher *et al.*, 1983; Sánchez-Vioque *et al.*, 1999a; Lqari *et al.*, 2002**). Por otra parte, se ha observado que cuando se emplea una baja concentración de sustrato, se produce un aumento en la viscosidad del extracto, lo cual dificulta la centrifugación de la suspensión. Sin embargo, también se ha descrito que una alta concentración genera volúmenes demasiado elevados, ocasionando con ello problemas de operabilidad del proceso. De igual modo, la duración de la extracción es un factor importante a tener en cuenta, el cual no suele ser superior a los 60 minutos ya que más tiempo disminuye los rendimientos por desnaturalización y coagulación de las proteínas debido a la formación de espumas (**Sefa-Dedeh y Stanley, 1979**).

**2) Etapa de concentración y/o purificación.** Esta etapa tiene por objeto la concentración de las proteínas y, sobre todo, su purificación frente a otros compuestos. Los procedimientos más habituales que suelen realizarse son los siguientes:

**a) Precipitación isoelectrica de las proteínas.** Las proteínas extraídas son precipitadas llevando la solución al pH correspondiente al pI de las proteínas, el cual suele estar entre valores de 4-5 (**Vani y Zayas, 1995**). El producto resultante se lava de una a tres veces con agua al mismo pH que el pI, para extraer los compuestos solubles retenidos por absorción. Posteriormente, mediante centrifugación las proteínas se separan del resto de las moléculas solubles. Finalmente, para obtener un aislado proteico en forma de polvo, a los extractos purificados y/o concentrados se les debe eliminar la mayor cantidad de agua posible, lo cual puede realizarse por liofilización (proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce a una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación) o secado por aspersion (proceso en el que los extractos proteicos son expuestos en forma de una nube a una corriente de aire seco y caliente en una cámara de secado, lo que permite la rápida evaporación de agua).

**b) Ultrafiltración.** Mediante este sistema las moléculas solubles no proteicas, de bajo peso molecular, atraviesan la membrana y constituyen el permeado, mientras que las proteínas son retenidas. El retenido final se suele dializar para eliminar las pequeñas moléculas solubles y el permeado se puede someter a osmosis inversa para recircular el agua (**Honig et al., 1987**). La principal ventaja de esta alternativa es que permite recuperar no solo las proteínas insolubles en el pI sino también las solubles, mientras que su principal inconveniente es el aumento del tiempo global y coste del proceso.

## 2.4.2. Usos y aplicaciones de aislados proteicos

El uso y aplicación de un aislado proteico como ingrediente alimentario depende principalmente de su calidad. Por esta razón es indispensable que una vez elaborado el aislado proteico, éste sea sometido a una evaluación tanto nutricional como funcional. La calidad nutricional de una proteína está relacionada con el tipo y proporción de aminoácidos que contiene, así como con su capacidad de asimilación (digestibilidad).

En la actualidad, los aislados proteicos son empleados en numerosas aplicaciones alimentarias, tal como se observa en la Tabla 2, ya que ofrecen una amplia gama de ventajas tanto económicas, nutricionales y/o funcionales (**Waggle *et al.*, 1989**).

**Tabla 2.** Principales ventajas en el uso de aislados proteicos

<b>Producto</b>	<b>Nutricionales</b>	<b>Funcionales</b>	<b>Económicas</b>
Emulsiones cárnicas	X	X	X
Carne picada	X		X
Músculos cárnicos intactos		X	X
Carne de aves	X	X	X
Tocino ahumado		X	X
Patés de hígado	X	X	X
Mariscos triturados	X	X	X
Sucedáneos de queso		X	X
Postres congelados	X	X	
Sopas y salsas		X	X
Formulas infantiles	X	X	X
Bebidas nutritivas para adultos	X		X
Alimentos dietéticos	X	X	X
Suplementos proteicos	X	X	X
Productos de panadería		X	
Leche de soya	X		X

De acuerdo con diversas investigaciones, el incremento del valor nutricional del producto final es la principal razón para el empleo de los aislados proteicos en formulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y/o deportistas, así como suplementos proteicos, por mencionar algunos. Por una parte, los formulados infantiles basados en los aislados proteicos se elaboran para proporcionar una nutrición que cubra las necesidades proteicas en niños debido a problemas de alergia alimentaria o intolerancia a la lactosa (**Rennie *et al.*, 1994**). Con respecto a las ventajas que otorgan las bebidas nutritivas para adultos y los suplementos proteicos, las primeras muestran una gran flexibilidad de formulación, además de efectos hipolipidémicos (**Kumomura, 2000**), mientras que los segundos son utilizados para el control dietético así como para enriquecer en proteínas el producto (**McMichael-Phillips *et al.*, 1998**).

En un gran número de aplicaciones, los aislados proteicos se usan tanto por sus propiedades nutricionales como funcionales. En referencia a las propiedades funcionales de las proteínas, son aquellas propiedades fisicoquímicas que determinan su comportamiento en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento o consumo, por lo que estas propiedades y la forma en la cual las proteínas interactúan con otros componentes de forma directa o indirecta pueden afectar sus aplicaciones, ya que la mayoría de ellas tienen lugar en alimentos tradicionales que ya tienen establecidos parámetros de utilización, así como su calidad y el grado de aceptación en los alimentos. La importancia de las propiedades funcionales varía con el tipo de producto alimenticio en el cual se pretenda emplear la proteína. Por ejemplo, las proteínas con una alta capacidad de retención de agua o aceite son deseables y se usan en productos cárnicos y de panificación o pastelería, mientras que las proteínas con una alta capacidad



emulsificante o espumado son adecuadas en aderezos para ensalada, salchichas, mortadela, confitería y pasteles (Ulloa *et al.*, 2011). Por este motivo, para lograr el éxito en estos productos en la industria y en el mercado, los aislados deben mantener esta calidad (color, sabor, aroma, textura, composición química y nutricional).

De acuerdo a lo descrito por Vioque *et al.* (2001), los aislados proteicos vegetales más extendidos son los de soya, ya que ofrecen múltiples ventajas, manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor. En los últimos años también se han producido aislados proteicos de otros cultivos como colza (Zhou *et al.*, 1990; Gonçalves *et al.*, 1997; Xu y Diosady, 1994; Mahajan y Dua, 1995), trigo (Hettiarachchy *et al.*, 1996; Ahmedna *et al.*, 1999), maíz (Lin *et al.*, 1987), garbanzo (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999), girasol (Saeed y Cheryan, 1988), frijol (Apostolatos, 1984; Chau *et al.*, 1997) y amaranto (Martínez y Añón, 1996).

De esta manera, el interés en el aprovechamiento de las proteínas vegetales provenientes de residuos agroindustriales ha ido en aumento y se han desarrollado mas eficientemente los procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la generación de concentrados y aislados proteicos. Sin embargo, estos aislados presentan dos grandes limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria, tal como son su baja solubilidad y su potencial alergenicidad. Estas razones, junto con la demanda de nuevos alimentos han conducido en los últimos años al desarrollo de procesos de hidrólisis proteica de una amplia gama de aislados proteicos vegetales.

## 2.5. Hidrolizados proteicos vegetales

La hidrólisis proteica se basa en la ruptura de enlaces peptídicos la cual genera péptidos de menor tamaño e incluso de aminoácidos libres, pudiendo producirse por métodos químicos o biológicos. A consecuencia de los efectos negativos que ocasiona la hidrólisis química sobre la calidad nutricional del hidrolizado por la formación de compuestos tóxicos, la hidrólisis enzimática se emplea con mayor frecuencia gracias a que se realiza bajo condiciones más reguladas de temperatura y pH, además de que de esta manera se reduce la formación de compuestos indeseables (**Gottschik, 1994; Flemming, 1989**). Lo que se busca en los hidrolizados proteicos es potenciar sus características funcionales, por ejemplo disminuyendo su viscosidad, aumentando la capacidad de agitación y dispersión, así como mejorando la solubilidad del producto final, las cuales resultan ser características deseables para la elaboración de múltiples productos alimenticios en comparación con la materia de partida.

La propiedad fundamental de un hidrolizado, la cual va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso, es su grado de hidrólisis, siendo definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El método más empleado para determinar el grado de hidrólisis es la titulación con TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico), gracias a que es muy sencilla de realizar y provee de una elevada reproducibilidad (**Adler-Nissen, 1979**). El grado de hidrólisis final está determinado principalmente por las condiciones empleadas (concentración del sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación) y las condiciones fisicoquímicas (pH y temperatura). Sin embargo, un factor muy importante

que también debe de ser considerado es la naturaleza de la enzima, refiriéndose al tipo y especificidad de actividad, la cual además de influir en el grado de hidrólisis también lo hara en el tipo de péptidos producidos (**Teichgräber *et al.*, 1993; Poutanen, 1987**). Partiendo de lo anteriormente descrito, los distintos tipos de proteasas involucradas en la hidrólisis enzimática pueden agruparse de acuerdo a su actividad catalítica en endopeptidasas (capaces de romper enlaces internos de la cadena proteica) o exopeptidasas (hidrolizan enlaces terminales de la cadena), las cuales a su vez se subdividen en aminopeptidasas (hidrólisis por el extremo N-terminal) y carboxipeptidasas (hidrólisis por el extremo carboxilo). Cabe resaltar que la especificidad de la proteasa varia en función de la secuencia aminoacídica, por ejemplo, algunas proteasas producen ruptura en donde haya un aminoácido particular, mientras que otras pueden reconocer varios aminoácidos. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente una amplia gama de proteasas grado alimentario, las cuales pueden ser clasificadas por su origen, modo de acción o con base en su sitio catalítico (Tabla 3).

La hidrólisis de los aislados proteicos vegetales habitualmente se lleva a cabo en un reactor con control de agitación, temperatura, pH y tiempo del proceso. Inicialmente, el sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilicen y posteriormente se añade la proteasa. Conforme transcurre el tiempo se produce una disminución del pH debido a la ruptura de los enlaces peptidicos, por lo cual debe de ajustarse constantemente el pH durante la hidrólisis para que la enzima actue eficientemente bajo sus condiciones optimas. Para finalizar el proceso, la inactivación de la enzima empleada puede realizarse con un aumento de temperatura, con una disminución de pH o con una combinación de ambos (**Benitez *et al.*, 2008**).

**Tabla 3.** Principales proteasas grado alimenticio disponibles comercialmente.

Tipo de proteasa	Origen	Nombre común o comercial	Fuente	Temp. (°C)	Interv. pH	Sitio de acción catalítica
Serinproteasa	Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30-60	7-9	* Lys (o Arg)
		Quimiotripsina		45-55	8-9	* Trp (o Tyr, Phe, Leu)
		Elastasa			6-8	* Ala
	Bacteriana	Subtilisina, Carlsberg, Alacalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	* AAhf
		Subtilisina, BPN Subtilisina Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	
Cisteinproteasas	Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	* Phe (o Val, Leu)
		Bromelina	Piña	20-65	5-8	AAhf
		Ficina	Latex de Ficus		5-8	
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	Phe (o Tyr, Leu)* Trp
		Quimosina	Becerro		4-6	(o Phe, Tyr)
	Fúngica	Aspergilopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *
		Newtasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40-50	3-6	Similar a la pepsina
Metaloproteasas	Animal	Carboxipeptidasa A	Pancreas		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lys
	Bacteriana	Neutrasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7.5	Phe, Leu, Val *
		Termolisina	<i>B. thermoproteolytics</i>		7-9	Ile, Leu, Val, Phe *
Preparaciones enzimáticas	Mezcla de papaína, quimopapaina y lisozima	Papaina	Fruto de la papaya		5-9	Amplia especif.
	Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa	Pancreatina	Pancreas (bovino y porcino)	30-80	7-9	Muy amplia especif.
	Mezcla de serin-, aspartato- y metalo- proteasas	Veron P, Sumicina LP, Biocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	Muy amplia especif.
	Mezcla de endo- y exo- proteasas	Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	Muy amplia especif.

\* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato

AAhf Indica AAs hidrofóbicos

Fuente: Qi y He, 2006; Adler-Nissen, 1986

## 2.6. Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos en alimentación

El grado y tipo de hidrólisis determinaran las propiedades del hidrolizado proteico así como el uso que se establezca para el mismo, por lo que, de acuerdo a lo descrito por **Vioque *et al.* (2001)**, en la actualidad los hidrolizados proteicos vegetales empleados para su uso en alimentación se pueden clasificar en tres grupos:

**a) Hidrolizados limitados con bajo grado de hidrólisis para la mejora de las propiedades funcionales (1-10%).** Se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora las propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, tal es el caso del poder emulsificante, espumante o la absorción de agua o aceite (**Krause y Schwenke, 1995; Vioque *et al.*, 2000**). De esta forma, los hidrolizados con mejor capacidad espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres (**Chaplin y Andrew, 1989**), mientras que aquellos que presentan una buena capacidad emulsificante son empleados en la fabricación de mayonesas, carne molida, salchichas o helados (**Turgeon *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1990; Süle *et al.*, 1998**). Por su parte, los hidrolizados que presentan una buena absorción de agua o aceite son utilizados en la elaboración de derivados cárnicos y en productos bajos en grasa (**Mannheim y Cheryan, 1992**).

**b) Hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como saborizantes.** Este tipo de hidrolizados se obtienen mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con HCl durante 4-24 horas y a temperatura entre 100-125°C. De este modo, el grado de hidrólisis dependerá del tiempo, temperatura y concentración de ácido empleado, lo cual influirá en los atributos sensoriales del producto final (**Manley**

*et al., 1981*). El sabor del producto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados. Sin embargo, la interacción de estos péptidos o aminoácidos con otros componentes como azúcares o lípidos son el principal factor involucrado en determinar su sabor. Dicha interacción puede producirse mediante las denominadas reacciones de Maillard, generando compuestos secundarios volátiles responsables del olor y sabor del producto (**Hsieh *et al.*, 1980**).

**c) Hidrolizados extensivos con grado de hidrólisis superior al 10% para su uso en alimentación especializada.** Este tipo de hidrolizados busca explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas nativas. Entre los factores que favorecen la utilización de los hidrolizados como suplemento proteico en la dieta se encuentran, desde un punto de vista funcional, su elevada solubilidad, la cual permite su utilización en alimentos líquidos, y desde un punto de vista nutricional, el hecho de que la absorción gastrointestinal de los péptidos de pequeño tamaño que componen el hidrolizado parecen tener mayor efectividad en comparación con las proteínas intactas o aminoácidos libres (**Silk *et al.*, 1985; Meredith *et al.*, 1990**).

Entre los sectores de la población hacia los cuales va dirigido este tipo de alimento se encuentran las personas de la tercera edad, quienes por la pérdida de apetito se puede llegar a generar una malnutrición que se relacione directamente con un incremento de enfermedades y mortalidad. Para este grupo de personas, comer mayor cantidad no es la solución idónea, pero la demanda de proteína necesaria podría cubrirse con bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos, ya que su ingesta es más atractiva que la de alimentos sólidos (**Ovensen, 1991**). Otro campo de aplicación es en nutrición deportiva, dirigida principalmente a atletas de alto rendimiento que practiquen

resistencia, halterofilia o fisicoculturismo. En este sentido, bebidas refrescantes suplementadas con péptidos pueden ingerirse durante o posterior al ejercicio (**Layman, 1987; Meredith et al., 1989; Brouns, 1997**). Estos hidrolizados también producen beneficios en las personas que realizan dietas, ya que estos suplementos le proporcionan al cuerpo cantidades adecuadas de proteínas con un mínimo de calorías, de manera que se mantiene el balance de nitrógeno y se reduce peso con la pérdida de grasas.

La aplicación medicinal mas reconocida de los hidrolizados proteicos por su impacto nutricional es la producción de hidrolizados hipoalergenicos, debido a que las consecuencias de una reacción alérgica pueden ir desde pequeños trastornos físicos hasta incluso la muerte por shock anafiláctico. Por otra parte, los hidrolizados proteicos de composición definida, por ejemplo aquellos en los que se eliminan los aminoácidos aromáticos, han sido propuestos para el tratamiento de enfermedades, tal es el caso de errores metabólicos congénitos, como la fenilcetonuria o tirosinamia, donde estos pacientes no tienen la capacidad para metabolizarlos (**Vioque et al., 1999**). Otro ejemplo se presenta en la elaboración de hidrolizados que cuenten con un sobreaporte de aminoácidos azufrados, los cuales son necesarios en estados hipermetabólicos, como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras (**George et al., 1997**).

Por este motivo, en los últimos años se ha observado un aumento en la producción de hidrolizados proteicos vegetales debido a la creciente demanda de alimentos específicos, así como por el aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas a las actuales de origen animal, lo cual conducirá a la generación de nuevos alimentos elaborados con aplicaciones específicas a partir de hidrolizados proteicos de origen vegetal.

## 2.7. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva

Los péptidos bioactivos son pequeñas secuencias de aminoácidos encriptados en proteínas que, durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal, ejercen diversas funciones metabólicas. Debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, no solo desde un punto de vista funcional o nutricional, sino también como componentes beneficiosos en los alimentos, en los últimos años se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Meisel, 2004).

En la actualidad, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos (Korhonen y Pihlanto, 2003; Pihlanto y Korhonen, 2003; Dziuba *et al.*, 2005), siendo interesante destacar que dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos es distinta. Entre las proteínas de origen vegetal de las que se han aislado péptidos bioactivos se encuentran las proteínas de soya, de trigo, de maíz, de arroz, de cebada y de girasol (Wang y González, 2005). En cuanto a las proteínas de origen animal, la leche y otros productos lácteos son los precursores de los péptidos bioactivos más estudiados, aunque también se han identificado estos péptidos en la ovoalbúmina de huevo (Korhonen y Pihlanto, 2003), en la carne (Korhonen y Pihlanto, 2003), en el músculo de pescado (sardina, atún, bonito) (Yamamoto *et al.*, 2003) y en la jalea real (Matsui *et al.*, 2002).



A continuación se mencionan los principales péptidos bioactivos descritos hasta el momento y sus efectos fisiológicos.

### **2.7.1. Péptidos con actividad opioide**

Son aquellos péptidos que presentan afinidad por receptores opiáceos y actúan, mediante la unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas. Estos péptidos han sido aislados de cereales, leches y tejidos animales (**Rutherford-Markwich y Moughan, 2005**).

Los péptidos opioides más estudiados son los derivados de proteínas lácteas (caseínas) (**Rutherford-Markwich y Moughan, 2005; Martínez Augustin y Martínez de Victoria Muñoz, 2006**). Una vez absorbidos, estos péptidos pueden viajar al cerebro y otros órganos y ejercer actividades farmacológicas similares a la morfina o el opio. En contraste con las casomorfina, algunos péptidos producidos por el desglose de  $\kappa$ -caseína pueden actuar como antagonistas de los opioides, es decir, que pueden inhibir el efecto de sustancias como la morfina (**Haque y Chand, 2006**).

En los adultos, los efectos de estos péptidos suelen limitarse al tracto gastrointestinal, ya que, o bien no son absorbidos, o escapan a la degradación enzimática en la pared intestinal (**Teschemacher et al., 1997**). Sin embargo, existen estudios que sugieren que algunos de ellos ( $\beta$ -casomorfina) pueden ser transportados de la sangre al tronco cerebral (**Pasi et al., 1993**) y al sistema cardiovascular en los lactantes (**Teschemacher et al., 1997**).

Los péptidos lácteos pueden participar en la regulación del apetito, modificando la actividad endocrina del páncreas para aumentar la producción de insulina (**Kitts et al., 1992**). Estudios en ratas indican que las  $\beta$ -casomorfina pueden modular la ingesta, estimulando la ingesta de grasa y reduciendo la ingesta de dietas ricas en hidratos de carbono (**Lin et al., 1998**). En este sentido, también algunos péptidos derivados del gluten de trigo administrados por vía intravenosa y oral en ratas dieron lugar a la estimulación postprandial de la liberación de insulina (**Fukudome et al., 1995**).

### **2.7.2. Péptidos con actividad antimicrobiana e inmunomodulante**

Los péptidos bioactivos con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras más estudiadas son aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos (**Gauthier et al., 2006**). Este efecto parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos, que se organizan estructuralmente y provocan la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (**Agawa et al., 1991**), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (**Bellamy et al., 1992**).

En la leche y también en el huevo se encuentran la lactotransferrina y la ovotransferrina. Ambas transferrinas poseen actividad antibacteriana frente a gran variedad de microorganismos. Esta actividad puede ser ejercida al menos mediante tres mecanismos distintos (**Farnaud y Evans, 2003; Orsi, 2004; Kovacs-Nolan et al., 2005**): a) secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias; b) produciendo alteraciones en la pared bacteriana; o c) mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

Los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos de destino también mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana **(Cudic y Otvos, 2002)**.

Péptidos derivados de las caseínas de la leche muestran también actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un amplio rango de microorganismos, entre los que se encuentran *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus pyogenes*. Estudios *in vivo* muestran efectos protectores de la israicina (derivado de la caseína) frente a *S. aureus* y *Candida albicans* en ratones y frente a mastitis en vacas y ovejas **(Marshal, 2004; Clare y Swaisgood, 2000)**.

También se ha descrito que la lactoferrina es capaz de inhibir la replicación de virus como el de la leucemia de células T del tipo I, el citomegalovirus, el virus de la hepatitis C o el herpes simple tipo I **(Martinez Augustin y Martinez de Victoria Muñoz, 2006)**.

La lisozima, presente también en la leche y el huevo, posee actividad antimicrobiana e inmunorreguladora, pudiendo mejorar la sinusitis crónica y normalizar la respuesta humoral y celular en pacientes con bronquitis crónica cuando se combina con inmunoterapia. Además, mejora la respuesta inmune en pacientes cancerosos inmunodeprimidos. Se ha sugerido que la inmunomodulación producida por la lisozima puede ser resultado de la estimulación de la función fagocítica y de la hidrólisis de productos de peptidoglucano que pueden actuar como adyuvantes o inmunomoduladores

(Kovacs-Nolan *et al.*, 2005; Asakura *et al.*, 1990; Sava, 1996; Li-Chan y Nakai, 1989).

Otros alimentos que también contienen péptidos con actividad antimodulante, aunque no tan estudiados como los lácteos, son la jalea real de la que se han aislado péptidos que estimulan la proliferación de monocitos humanos (Schmitzová *et al.*, 1998), péptidos derivados de las proteínas del arroz y la soya que estimulan los sistemas de inmunidad no específica (Kitts y Weiler, 2003) y péptidos del trigo sarraceno y pimiento (Leung y Ng, 2007; Diz *et al.*, 2006).

### 2.7.3. Péptidos con actividad antioxidante

Los antioxidantes no solo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico. Los radicales libres son unas moléculas que están en continua formación en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de estos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades (Bray, 2000).

Los péptidos antioxidantes tienen la capacidad tanto de secuestrar radicales libres como de formar complejos con los iones metales que catalizan las reacciones de los radicales libres (Chen *et al.*, 1998). Tirosina e histidina son componentes representativos de este tipo de péptidos ya que son susceptibles a la oxidación. La metionina, lisina y triptófano también tienen propiedades similares (Dean *et al.*, 1997). Parece ser que la actividad antioxidante de estos péptidos suele aumentar con la

presencia de residuos de prolina en sus secuencias ya que la presencia de residuos hidrofóbicos eleva las posibilidades de interacción con el ácido linoleico (**Chen et al., 1998**). Se han descrito péptidos con actividad antioxidante en los productos de hidrólisis de la fracción  $\beta$ -conglucina de soya (LLPHH y VIPAGYP) por la proteinasa S (**Chen et al., 1995**). Se ha observado que estos péptidos, así como sus análogos sintéticos, inhiben la oxidación del ácido linoleico *in vitro*.

#### **2.7.4. Péptidos con actividad transportadora de iones**

Los caseinofosfopéptidos son fosfopéptidos aislados a partir de la caseína que pueden formar sales solubles organofosforadas y funcionar como transportadores de diferentes iones, especialmente calcio y hierro (**Sato et al., 1986; Kitts y Yuan, 1992**).

#### **2.7.5. Péptidos con actividad antihipercolesterolemia**

La hiperlipidemia, en especial la hipercolestolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Recientemente se ha demostrado que los péptidos de la soya pueden ser responsables de su actividad hipocolesterolemia, ya que se ha observado que hidrolizados de proteína de soya mostraron un mayor descenso del colesterol plasmático que la proteína de soya intacta (**Nagaoka et al., 1999**).

Este efecto hipocolesterolemiante de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones de los mismos: a) los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente a la represión de la solubilidad del colesterol (**Nagaoka *et al.*, 2001**); y b) algunos péptidos pueden regular al alza los receptores LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta (**Sirtori *et al.*, 1995**).

Ademas de los péptidos derivados de soya, otros péptidos bioactivos con efecto hipocolesterolémico han sido obtenidos a partir de la  $\beta$ -lactoglobulina, hidrolizado de proteína de carne de cerdo (**Morimatsu y Kimura, 1992; Morimatsu *et al.*, 1996**) y proteína vegetal (*Brassica carinata*) de acuerdo con **Pedroche *et al.* (2007)**.

### **2.7.6. Péptidos con actividad antitrombótica**

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y esta mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) del fibrinógeno. Por lo tanto, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos (**Miyashita *et al.*, 1999**).

Los principales péptidos aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la

interacción de la  $\kappa$ -caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con trombina.

Determinadas secuencias peptídicas de la  $\kappa$ -CN, denominadas casoplatelinas, son similares a la cadena  $\Upsilon$  del fibrinógeno (**Darragh, 2002**). Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados de la  $\kappa$ -CN bovina son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena  $\Upsilon$  del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (**Jollès et al., 1986**). Estos péptidos son capaces de fijarse sobre receptores específicos situados en la superficie de las plaquetas, impidiendo así la formación del trombo.

Péptidos derivados de la lactoferrina presentan también actividad antitrombótica a través de otro mecanismo distinto al de la caseína, inhibiendo, de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a la homología con el fragmento f(572-575) de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (**Mazoyer et al., 1990**). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (**Shebuski et al., 1989**) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (**Cook et al., 1988**).

En el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles elaboradas con leche de vaca se han encontrado secuencias peptídicas en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal (**Chabance et al., 1998**). Estudios más recientes han demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que había ingerido leche o yogur (**Chabance et al., 1998**).

### 2.7.7. Péptidos con actividad antihipertensiva

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35% de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Debido a esto, los alimentos que presentan péptidos con actividad antihipertensiva son de gran interés.

El mecanismo antihipertensivo mas estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es una Zn-metalopeptidasa que se expresa como una ectoenzima unida a membrana en células endoteliales, fundamentalmente del sistema vascular, la cual cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (ocapéptido). La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua y provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina. La renina libera el decapeptido angiotensina I del sistema renina-angiotensina. Este sistema quizás es el más importante de los diferentes mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores implicados en la regulación de la presión sanguínea (**Ondetti y Cushman, 1982**).

La ECA actúa simultáneamente en el sistema cininacalicroína catalizando la degradación de las bradicininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, y de esta manera se favorece el incremento de la presión arterial. El incremento de la



disponibilidad de bradicininas debido a la inhibición de la ECA puede ser parcialmente responsable del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA sobre presión sanguínea.

Algunos trabajos se han centrado en la producción y aislamiento de péptidos inhibidores de la ECA, procedentes de proteínas de diferentes alimentos (**Hernández-Ledesma et al., 2005; Miguel et al., 2005; Gouda et al., 2006**). Algunos autores han encontrado que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos (**Silva et al., 2006; Hernández-Ledesma et al., 2003**).

Maruyama y Suzuko (**Maruyama y Suzuki, 1982**) fueron los primeros en aislar un péptido inhibidor de la ECA a partir de un hidrolizado de caseína (dodecapeptido). Por otra parte, Yamamoto *et al.*, (**Yamamoto et al., 1994**) han demostrado que las leches fermentadas con *L. helveticus* son las que mas actividad inhibitoria de la ECA presentan, debido a la alta actividad proteolítica extracelular de esta cepa.

Algunos péptidos inhibidores de la ECA han sido obtenidos por digestión proteica enzimática a partir de proteína muscular de atún (**Astawan et al., 1995**), músculo de sardina (**Suetsuna y Osajima, 1989**), bonito seco (**Fujita et al., 1995**), algas (**Suetsuna y Chen, 2001**) y otros productos marinos.

Algunos hidrolizados de proteínas han mostrado efectos *in vitro* (mediante la inhibición de la ECA) e *in vivo* (efectos antihipertensivos). La administración de un hidrolizado de músculos de bonito a ratas espontáneamente hipertensas ha permitido suprimir la hipertensión después de un periodo de cinco semanas de tratamiento utilizando una dosis de 15 a 60 mg/kg (**Mazoyer et al., 1990**).

Se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA en muchas fuentes vegetales, como soya (**Korhonen y Pihlanto, 2003**), germen de trigo (**Matsui *et al.*, 1999**) y garbanzo (**Yust *et al.*, 2003**). En el gluten de trigo se aisló un hexapéptido que mostró una actividad antagónica con respecto a la angiotensina I *in vivo*. Recientemente, un hidrolizado de gluten ha conseguido una reducción de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas 2 horas después de la administración intravenosa (**Saiga *et al.*, 2003**).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios que describen la existencia de péptidos con actividad antihipertensiva en otras fuentes alimentarias, como músculo de cerdo y pollo, huevos, ajo, calamar, gelatina, hígado, sake, vino, autolisados bacterianos, hongos, etc. Sin embargo, la información sobre péptidos bioactivos generados a partir de ellos es todavía limitada.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de proteínas vegetales en alimentación humana ha aumentado considerablemente en los últimos años tanto por razones económicas como nutricionales. De ello que la obtención de aislados proteicos de origen vegetal, pese a que hoy en día es un proceso bien establecido, tomen gran importancia por su alto aporte nutricional así como por la mejora de algunas propiedades funcionales en ciertos alimentos. Sin embargo, su utilización a nivel comercial se encuentra prácticamente limitada debido a que presentan una baja solubilidad y son potencialmente alergénicos. Por este motivo, la hidrólisis enzimática de estos aislados proteicos ha adquirido un gran desarrollo en las dos últimas décadas ya que se obtiene un producto con características nutricionales mejoradas y propiedades funcionales excelentes, además que se han destruido compuestos no deseables como pueden ser inhibidores de proteasas y los epitopos responsables de alergias. De este modo, la obtención de péptidos bioactivos a partir de las harinas desengrasadas de amaranto, quínoa y chia, pese a requerir de un proceso mas extenso y costoso para su obtención, pretende ser una alternativa de aprovechamiento de estos subproductos para que puedan ser empleados en la elaboración de alimentos funcionales, los cuales contarán con una notable actividad antioxidante, antihipertensiva y antiinflamatoria, siendo una interesante opción comercial para las personas que presentan ciertas enfermedades crónicas asociadas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de las harinas desengrasadas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) y chia (*Salvia hispanica* L.), presentan actividad antioxidante y antihipertensiva, además de buenas características tecnofuncionales, lo que los convierte en alternativas agroalimentarias de interés para ser empleadas en la elaboración de alimentos funcionales que mejoren las características nutricionales del producto así como para el tratamiento de enfermedades crónicas en humanos.

## **5. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO**

Evaluar el uso de proteínas de origen vegetal (amaranto, quínoa y chia) y sus hidrolizados proteicos como sustituto de derivados alimentarios con funcionalidad específica.

### **5.1 Objetivos específicos**

- a) Caracterizar fisicoquímicamente los productos proteicos vegetales.
- b) Estandarizar los procesos de obtención de aislados e hidrolizados proteicos.
- c) Caracterizar de manera funcional los hidrolizados proteicos.
- d) Determinar la actividad biológica de los hidrolizados proteicos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Aparatos

#### 6.1.1. Cromatografía líquida

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography) (Pharmacia Biotech.). El sistema FPLC consta de un controlador LCC 500 PLUS, dos bombas P-500, monitor-detector (280 y 254 nm) de luz ultravioleta UV-M y colector de fracciones LKB FRAC-200. El sistema está informatizado mediante el programa FPLC Director.

Por último, se usó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Waters, Milford, MA, EEUU). El equipo de HPLC está integrado por un controlador 600E, inyector automático Wisp 712 y detector ultravioleta-visible modelo 484. La adquisición de datos y el procesado de los mismos se realizó mediante el programa informático Millennium<sup>32</sup> Login versión 3.2. La temperatura de la columna se reguló con un controlador de temperatura Julabo F10 (Seelbach, Alemania).

#### 6.1.2. Microanalizador elemental

Las mediciones de nitrógeno se realizaron en un microanalizador LECO modelo CHNS-932 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU). El aparato consta de un sistema con cuatro detectores individuales, tres de ellos con un sistema de detección por

infrarrojos (C, H y S) y uno por termoconductividad diferencial para N, un PC interno compatible con pantalla electroluminiscente sensible al tacto equipado con un software de operación interactivo CHNS y una balanza analítica micromuestra modelo M2P (Sartorius, Gottingen, Alemania) conectada con el microanalizador.

### 6.1.3. Espectrofotómetro

Modelo DU-640 Spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EEUU) equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (UV).

### 6.1.4. Centrífuga

Modelo RC5C de Sorvall Instruments (Wilmington, DE, EEUU) provista de rotores SS-34 y GSA.

### 6.1.5 Otros aparatos

Liofilizador modelo Freeze Mobile 3 (Virtis, Gardiner, NY, EEUU), cromatógrafo de gases con una columna capilar Supelco SP2380 de sílice fundido (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU), rotavapor Eyela (Tokio Rikakikai CO. Ltd., Tokio, Japón), estufa modelo 201 de la casa Selecta (Barcelona, España), balanza de precisión ( $\pm 0.1$  mg) AJ100 (Mettler, Alemania), homogeneizador Omnimixer 17220 de Sorvall Instruments y un lector de microplacas de fluorescencia (Thermo Electron).

## 6.2. Materiales

### 6.2.1. Material vegetal

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. fueron obtenidas de Grupo Xaxeni S. de R.L. de C.V. (San Martín Tepetlixpan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) y de Vizana Nutrition (Monclova, Coahuila, México). El peso de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. fue de  $93.480 \pm 2.257$  mg/100 semillas con unas dimensiones de  $0.914 \pm 0.54$  mm de ancho x  $1.292 \pm 0.048$  mm de diametro, para *Chenopodium quinoa* Willd. fue de  $387.450 \pm 5.013$  mg/100 semillas con unas dimensiones de  $1.315 \pm 0.153$  mm de ancho x  $2.000 \pm 0.048$  mm de diametro y para *Salvia hispanica* L. fue de  $118.980 \pm 1.524$  mg/100 semillas con unas dimensiones de  $0.826 \pm 0.011$  mm de ancho x  $2.110 \pm 0.098$  mm de largo x  $0.908 \pm 0.013$  mm de diametro.

### 6.2.2. Patrones para la identificación de proteínas (filtración en gel)

Para la calibración de la columna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia Biotech.) se emplearon los siguientes patrones: azul dextrano (2000 kDa) (Pharmacia Biotech.), catalasa (240 kDa) (Serva, Heidelberg, Alemania), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), ribonucleasa (13.7 kDa), citocromo C (12.5 kDa) (Pharmacia Biotech.) y bacitracina (1.45 kDa) (Sigma Chemical Co.).



### 6.2.3. Enzimas usadas en la determinación del contenido de fibra total

Solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable (20000-60000 U/mL), solución de amiloglucosidasa (6 U/mg) y proteasa (Alcalasa 2.4 UA/g) de Sigma Chemical Co.

### 6.2.4. Enzimas usadas en la obtención de hidrolizados proteicos para la mejora de propiedades funcionales

La enzima usada fue Alcalasa® 2.4 L (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) que cumple con las especificaciones recomendadas por la FAO/OMS relativas a enzimas de uso alimentario. La Alcalasa® 2.4 L es una endoproteasa, producida a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es Subtilisin A, que muestra una actividad de 2.4 Unidades Anson/g de enzima, siendo definida la Unidad Anson como la cantidad de enzima necesaria para digerir hemoglobina en condiciones estándar produciendo una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético que dan el mismo color con reactivo de Folin que un miliequivalente de tirosina (Anson, 1938).

Otra enzima empleada fue Flavourzyme® 1000 MG (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) que cumple también con las especificaciones por la FAO/OMS relativas a enzimas de uso alimentario. La Flavourzyme® 1000 MG es un complejo exoproteasa y endoproteasa producida a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*. Esta enzima muestra una actividad de una Unidad LAP/g de enzima (unidad de leucina aminopeptidasa),

siendo definida la Unidad LAP como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu\text{mol}$  de leucina-p-nitroanilida por minuto.

Las características físicas de la enzima así como actividad enzimática respecto a la condiciones de pH y temperatura son mostradas en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Propiedades bioquímicas de las proteasas Alcalasa® 2.4 L y Flavourzyme® 1000 MG.

<b>Características</b>	<b>Alcalasa® 2.4 L</b>	<b>Flavourzyme® 1000 MG</b>
<b>Tipo de acción</b>	endopeptidasa inespecífica	exopeptidasa y endopeptidasa
<b>Actividad enzimática</b>	2.4 UA/g de enzima	1 ULAP/g de enzima
<b>Peso molecular (Da)</b>	27300	difiere (complejo exo-endoproteasa)
<b>Inhibidores enzimáticos</b>	DFP, PMSF	DFP, PMSF
<b>pH óptimo de acción</b>	8	7
<b>T óptima de reacción</b>	50-60° C	50° C
<b>Inactivación enzimática</b>	pH 8 85°C 10 min	pH 7 85°C 10 min

Fuente: Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca

## 6.3. Métodos

### 6.3.1. Determinación cuantitativa del contenido graso

Previamente, las semillas se molieron en un equipo Retsch GM 200 a 10000 rpm durante 30 segundos y posteriormente se determinó el contenido de humedad mediante un analizador electrónico. El contenido total en lípidos fue determinado por el contenido en aceite extraído de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. mediante hexano en un soxhlet durante 9 h y expresado como porcentaje (%) en masa del producto (p/p).

### 6.3.2. Determinación cuantitativa de la composición de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de la fracción oleica fue determinado según el método de Garcés y Mancha (1993). La determinación de los ácidos grasos se realizó mediante los ésteres metílicos de estos ácidos grasos. Para ello, 3 mL de heptano y 0.5 mL de KOH/MeOH 2N fueron añadidos a 50 mg de aceite de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L., agitando fuertemente y esperando para que se separaran las fases. Tras lo anterior, se tomó 1  $\mu$ L de sobrenadante para análisis por cromatografía gaseosa. Como patrón interno se usó el ácido heptadecanoico (C<sub>17:0</sub>). El cromatógrafo de gases utilizado fue equipado con una columna capilar Supelco SP2380 (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.2  $\mu$ m de grosor de fase) de sílice fundido (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). El gas portador usado fue

hidrógeno con una presión en cabeza de columna de 12 psi y un flujo de 1 ml/min, empleándose nitrógeno como gas auxiliar. La temperatura del inyector y del detector fue de 220° C y la del horno de 170° C. Los ácidos grasos se identificaron por comparación con patrones estándar.

### 6.3.3. Determinación cuantitativa de proteínas

De acuerdo con el método de Dumas (1831), el contenido proteico se determinó por análisis elemental como % N x 6.25 usando un analizador LECO CHNS-932.

### 6.3.4. Determinación de cenizas y humedad

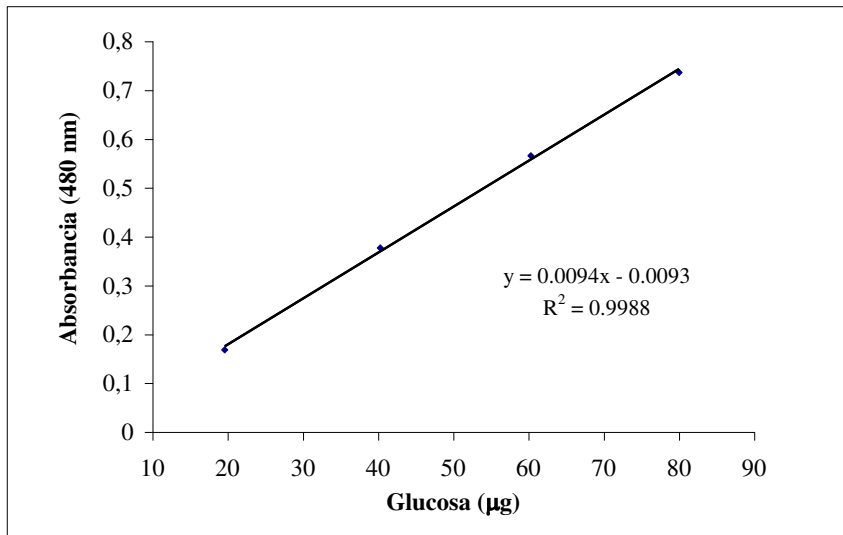
La humedad se calculó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca a 110° C hasta peso constante. El contenido de cenizas se determinó también por gravimetría, incinerándose las muestras a 550° C durante 72 h.

### 6.3.5. Determinación de polifenoles y azúcares

Ambos ensayos se realizaron a partir del mismo extracto etanólico que se preparó extrayendo las muestras (2 g) con etanol al 96 % en un soxhlet durante 16 h. El extracto final se llevó a un volumen fijo de 100 mL.

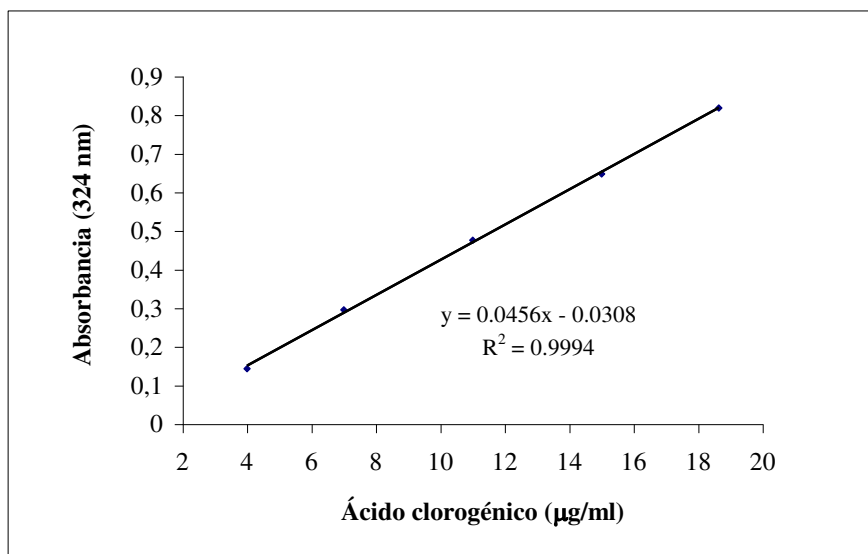
Los azúcares solubles se determinaron según Dubois *et al.* (1956). Este método se basa en la reacción coloreada que tiene lugar entre los azúcares, el fenol y el ácido

sulfúrico. Alícuotas del extracto etanólico (100  $\mu\text{L}$ ) se llevaron a 1 mL con agua, añadiéndose 1 mL de fenol al 5 % en agua y 5 mL de ácido sulfúrico (98.0% de pureza). Se agitaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 480 nm frente a un blanco. La determinación cuantitativa se hizo mediante una recta de calibración preparada a partir de una solución de 10.3 mg de glucosa por mL (Figura 11). El contenido en azúcares solubles se refirió a las muestras extraídas en tanto por ciento (p/p).



**Figura 11.** Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de azúcares solubles.

El contenido en polifenoles de las muestras se determinó según el procedimiento de Moores *et al.* (1948) que cuantifica los polifenoles a partir de su absorbancia a 324 nm. La recta de calibración se hizo usando una solución patrón de ácido clorogénico con una concentración de 0.74 mg/mL (Figura 12). Los contenidos en polifenoles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento (p/p).



**Figura 12.** Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de polifenoles

### 6.3.6. Determinación de fibra total

El contenido en fibra se determinó según Burkitt *et al.* (1974). Este método está basado en la digestión de las muestras por las enzimas  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa, y posterior determinación del residuo resultante por gravimetría. Las muestras desengrasadas (1g) se agitaron en 40 mL de tampón MES 0.05 M, TRIS 0.05 M pH 8.2. Se añadió 50 µL de la solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable e incubó con agitación durante 15 minutos a 95-100° C. Se enfrió a 60° C y añadió 300 µL de una solución de Alcalasa® 2.4L, manteniéndola en agitación continua a 60° C durante 30 minutos. Posteriormente se ajustó a pH 4.5 mediante HCl 0.5 N y se añadieron 300 µL de la solución de amiloglucosidasa e incubó con agitación constante a 60° C durante 30 minutos. Una vez finalizada la digestión, a las muestras se les añadió 225 mL de etanol al 96% a 60° C, dejándose precipitar la muestra 1 h a temperatura ambiente. Se filtraron

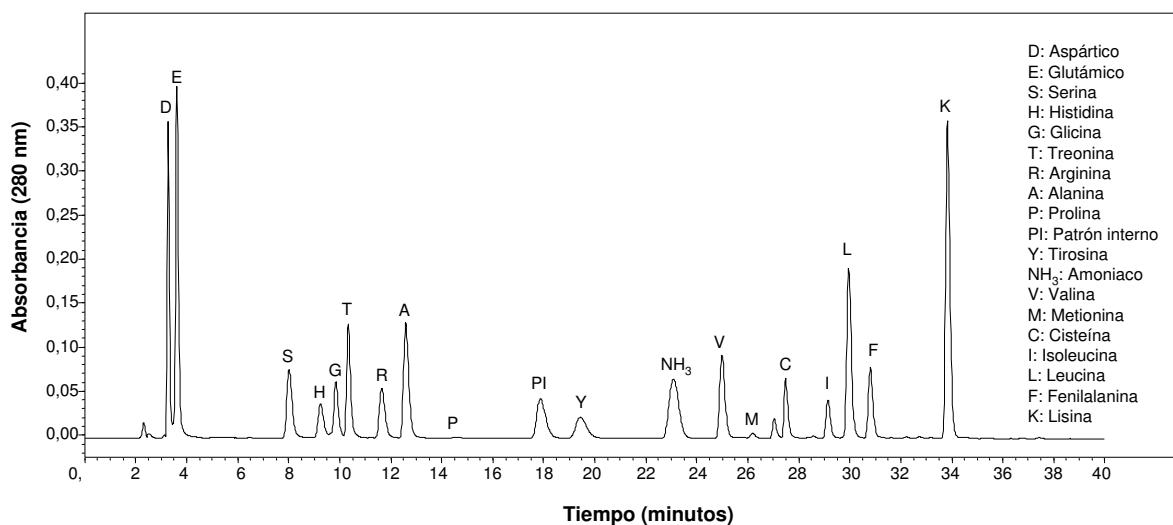
las muestras a través de filtros con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , lavando el retenido con etanol 78%, etanol 96% y acetona. Al residuo, una vez secado en estufa a 110° C y pesado, se le determinó el contenido en cenizas y proteínas. El porcentaje en fibra total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Residuo (g)} - \text{Proteínas (g)} - \text{Cenizas (g)}}{\text{Muestra (g)}} \times 100$$

### 6.3.7. Determinación cuantitativa de aminoácidos

Se llevó a cabo mediante el método publicado por Alaiz *et al.* (1992). Las muestras (2-4 mg) se hidrolizaron con 4 mL de HCl 6 N y 200  $\mu\text{L}$  de ácido L- $\alpha$ -aminobutírico a una concentración de 21.2 mg/50 mL agua, a 110° C durante 24 h en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en el rotavapor y se redisolvieron con tampón borato sódico 1 M, azida sódica 0.02 % pH 9.0, llevándolas a un volumen final de 25 mL. La derivatización de los aminoácidos se hizo a 50° C durante 50 minutos con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo (6  $\mu\text{L}$  en 3 mL de la muestra). La separación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub> 4  $\mu\text{m}$  de fase inversa (Waters) de 300 x 3.9 mm, usándose un sistema de gradiente binario con acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02 % pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes y un horno a 50 °C. Se empleó un detector de absorbancia UV-Vis (280 nm) y un volumen de inyección inicial de 20  $\mu\text{L}$ . El flujo fue de 0.9 mL/min y se utilizó el siguiente programa: tiempo 0-3 min gradiente lineal desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3-13 min elución con A:B (86:14); tiempo 13-30 min gradiente lineal

desde A:B (86:14) hasta A:B (69:31); tiempo 30-35 min elución con A:B (69:31). Como patrón interno se utilizó ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico, calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de rectas de calibración construidas para cada uno de ellos. Los aminoácidos utilizados para hacer las rectas de calibración se sometieron a las mismas condiciones que las muestras para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida. Los resultados se expresaron en tanto por ciento (p/p) (Figura 13).

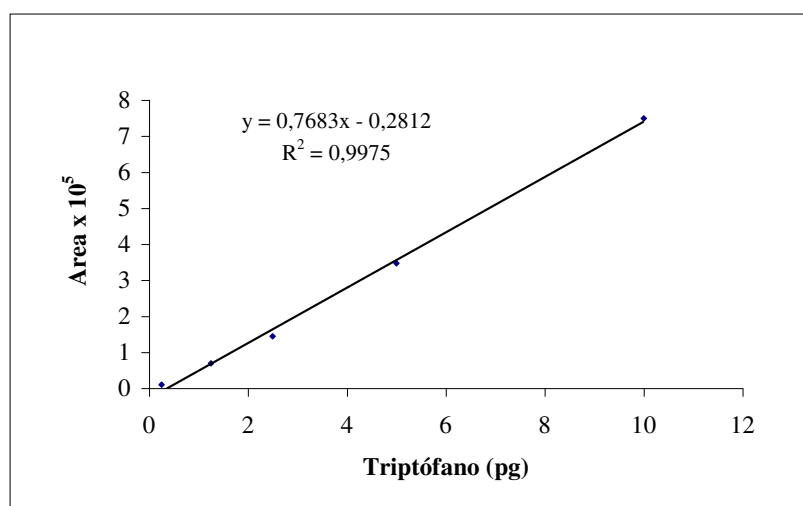


**Figura 13.** Perfil cromatográfico obtenido tras el análisis de la composición aminoacídica de BSA mediante HPLC.

La determinación del triptófano se realizó por el método de Yust *et al.* (2004). Las muestras (15 mg) se hidrolizaron con 3 mL de NaOH 4 N a 110° C durante 4 h en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7 usando HCl 12 N. Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 25 mL con tampón borato sódico 1 M pH 9. El análisis se



llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub> 4 μm de fase inversa (Waters) de 300 x 3.9 mm, usándose un sistema isocrático binario con acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02 % pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes en relación 91:9, siendo el flujo de 0.9 mL/min (detector de absorbancia UV-Vis; 280 nm; volumen de inyección: 20 μL; temperatura del horno: 50°C). El contenido en triptófano se determinó a partir de una recta de calibración preparada con L-triptófano (Figura 14).



**Figura 14.** Recta de calibración obtenida para la determinación cuantitativa de triptófano.

### 6.3.8. Determinación de propiedades funcionales

#### 6.3.8.1. Solubilidad

Las muestras se disolvieron en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (5% p/v) ajustándose en un rango de pH de 2-12 con NaOH 1 N o HCl 1 N y se mantuvieron en agitación durante 1 h a temperatura

ambiente, centrifugándose posteriormente a 11000 rpm durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les determinó su contenido en proteínas por el método de Dumas (1831) y los resultados se refirieron como porcentaje de proteína solubilizada respecto al contenido de proteína total.

#### *6.3.8.2. Absorción de agua*

Se determinó de acuerdo al método descrito por Beuchat (1977) a temperatura ambiente (25°C) con ligeras modificaciones. Se emplearon 0.5 g de muestra en 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, ajustando el pH a 7 y agitando en un vortex hasta homogenizar la muestra. A continuación se centrifugo a 3000 rpm durante 30 minutos, y los resultados se expresaron como porcentaje de agua retenida por gramo de muestra.

#### *6.3.8.3. Absorción de aceite*

La absorción de aceite se determinó de acuerdo al método descrito por Beuchat (1977) a temperatura ambiente (25°C) con ligeras modificaciones. Se colocaron 0.5 g de muestra en tubos de centrifuga de 15 mL, luego se añadieron 5 mL de aceite de maíz y el conjunto se agitó en un vórtex durante 1 minuto. Por último se centrifugo a 3000 rpm durante 30 minutos, expresando los resultados como porcentaje de aceite retenido por gramo de muestra.

#### *6.3.8.4. Actividad y estabilidad emulsificante*

Se determinó según el método de Yasumatsu *et al.*, (1992) con ligeras modificaciones, para lo cual se mezcló 0.5 g de muestra con 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, agitando durante 15 minutos. Luego, se ajustó el pH a 7 y se llevó el volumen a 15 mL con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Posteriormente, se mezclaron partes iguales (15 mL) de esta solución con aceite de maíz en un homogenizador (OMNI GLH-01 International) por 5 minutos y centrifugado a 1300 rpm. La emulsión fue expresada en términos de porcentaje, como la altura de la capa emulsificada con respecto al total del líquido.

#### *6.3.8.5. Capacidad y estabilidad espumante*

Se determino de acuerdo a lo indicado por Bencini (1986) con ligeras modificaciones, para lo cual se mezclaron 0.5 g de muestra y 25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> en un homogenizador (OMNI GLH-01 International) a 4000 rpm durante 3 minutos. La espuma resultante se transfirió a un cilindro graduado de 50 mL para medir el volumen de espuma inicial y final luego de 30 segundos. La capacidad espumante se expresó como el porcentaje de aumento en volumen. La estabilidad espumante se determinó midiendo el volumen de espuma que se mantiene tras 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos en reposo a temperatura ambiente y se expresó como tanto por ciento respecto al volumen de la espuma inicial.

#### 6.3.8.6. *Capacidad gelificante.*

Se determinó según lo indicado por Chau y Cheung (1997) preparando suspensiones de la muestra en agua destilada al 4, 8, 12, 13, 14, 16,18 y 20% (p/v). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 1 hora y luego en un baño de hielo durante 1 hora. Los resultados se expresaron de forma cualitativa como la presencia o no de la gelificación.

#### 6.3.8.7. *Capacidad de hinchamiento*

Se determinó según Robertson *et al.*, (2000) y Aguilera (2009). Se pesaron 100 mg de muestra en un cilindro graduado, luego se agregó agua destilada hasta 10 mL, agitando suavemente para dispersar la muestra. Posteriormente, se dejó en reposo durante 16 horas para lograr su hidratación, midiendo el volumen final que ocupa la muestra. Los resultados se expresan en mL/g de muestra.

### 6.3.9. Determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración en gel

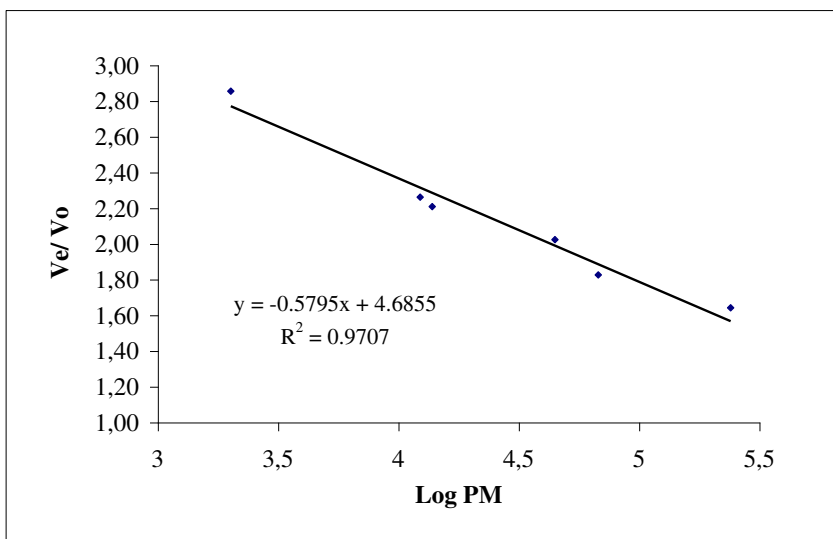
La estimación de los pesos moleculares y la purificación de fracciones peptídicas de las proteínas y de los hidrolizados proteicos se realizó mediante cromatografía de filtración en gel de acuerdo a lo descrito por Lqari *et al.* (2005).

Para extractos crudos y proteínas de alto peso molecular, el análisis de las muestras se llevó a cabo en un sistema de FPLC equipado con una columna Superose 12 HR 10/30 con un rango de separación de 300-1 kDa. La elución se realizó con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0.5 M, azida sódica 0.02 % y monitorizada a 280 nm, siendo el flujo analítico de 0.4 mL/min.

Los pesos moleculares de las muestras para la columna Superose 12 HR se determinaron mediante la utilización de patrones de peso molecular conocido (apartado 6.2.2 de materiales), obteniéndose una recta de calibrado que relaciona los volúmenes de elución con el logaritmo de los pesos moleculares (Figura 15):

$$V_e/V_o = -0.5795 \log PM + 4.6855 \text{ siendo } V_e = \text{volumen de elución} \\ V_o = \text{Volumen de exclusión (6.08 mL).}$$

Las muestras antes de ser inyectadas se filtraron por un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . El volumen inyectado de las muestras y la concentración de las mismas fueron 200  $\mu\text{L}$  y 2 mg de proteína por mL, respectivamente



**Figura 15.** Recta de calibración obtenida para la determinación de los pesos moleculares mediante la columna de filtración en gel Superose 12 HR.

### 6.3.10. Comparación de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida

Con las muestras de harina, aislado e hidrolizado proteico obtenidas a partir de amaranto, quínoa y chía, se desarrollaron geles de poliacrilamida con dodecilhidrogenosulfato sódico (SDS-PAGE) para muestras con proteínas de peso molecular intermedio y en estado desnaturalizado.

Las electroforesis SDS-PAGE se realizaron en geles de 0.75 mm de espesor cuya composición fue la siguiente:

	<u>Gel de concentración 5 % T</u>	<u>Gel de separación 15 % T</u>
Acrilamida/Bisacrilamida 30 % T 1.2 % C	830 $\mu$ L	4500 $\mu$ L
TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8	-	3000 $\mu$ L
TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8	613 $\mu$ L	-
SDS 10 %	50 $\mu$ L	90 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3750 $\mu$ L	1410 $\mu$ L
Persulfato amónico 10 % (p/v)	30 $\mu$ L	35 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	15 $\mu$ L

T = concentración total de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida) y  
C = grado de entrecruzamiento respecto a la concentración total de T.

La separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 60 V en el gel de concentración y a 120 V en el gel de separación. El tampón electrolito empleado estaba compuesto por TRIS 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1 % pH 8.4. Una vez terminada la electroforesis, las muestras fueron fijadas con una solución compuesta por ácido acético 8 %, metanol 20 % y a continuación teñidas en una solución de Coomassie Brilliant Blue G 250 al 0.25 % en ácido acético 10 %, metanol 45 %. El desteñido de los geles se realizó en una solución de ácido acético 7.5 %, metanol 20 %.

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó para cada gel mediante rectas de calibración en las que se representaron las movilidades relativas de las proteínas frente a los logaritmos de sus pesos moleculares. Como patron se utilizó el marcador de bajo peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa) de la casa comercial Bio-Rad.

Las muestras para electroforesis SDS-PAGE se prepararon mezclándolas con tampón de solubilización a pH 6.8 en proporción 1:1 (v:v) cuya composición se muestra a continuación:

TRIS-HCl	0.05 M
EDTA	0.57 %
DTT	0.26 %
SDS	3.3 %
Sacarosa	20 %
Azul de bromofenol	0.008 %

### 6.3.11. Obtención de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. se trituraron en un equipo Retsch GM 200 (10000 rpm durante 30 segundos) y desengrasaron con hexano en un soxhlet durante 9 h. Una vez evaporado el hexano, la harina desengrasada se molió nuevamente para conseguir un tamaño de partícula más homogéneo siendo almacenada en recipientes herméticamente cerrados.

### 6.3.12. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

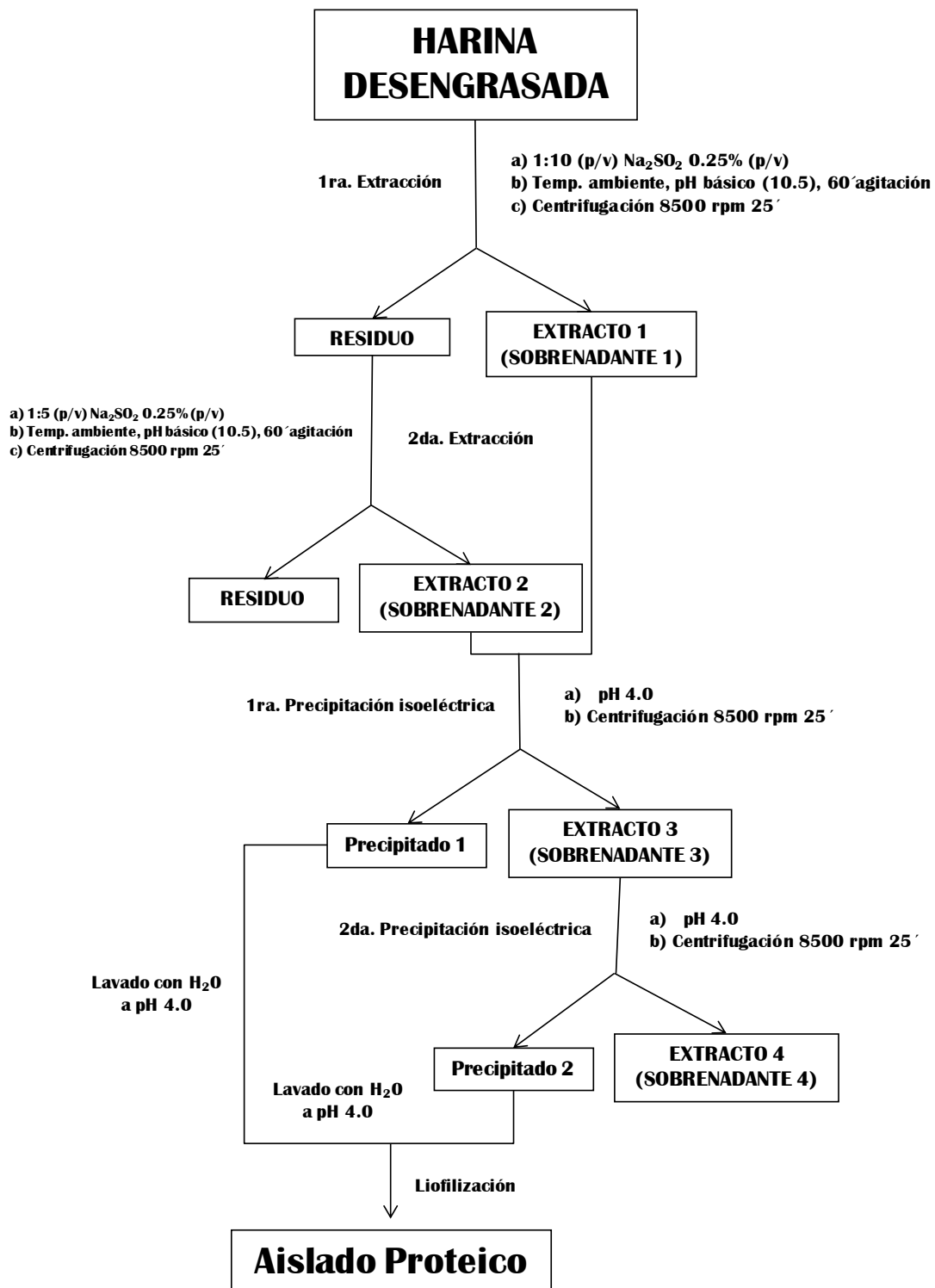
Se extrajeron las proteínas de 10 g de harina durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 mL de una solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.25 % (p/v) ajustando el pH a 10.5 con NaOH 6 N. Tras centrifugar el extracto a 8500 rpm durante 25 minutos, y recuperar el sobrenadante, al residuo se le volvieron a extraer las proteínas con 50 mL en las mismas condiciones de la primera extracción. De nuevo se centrifugó, reuniéndose ambos sobrenadantes. Del sobrenadante total se tomaron alícuotas de 10 mL que, ajustadas a distintos pHs desde 2 hasta 12 en intervalos de 2, se centrifugaron a 8500 rpm durante 25 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes a los que se les midió el contenido en nitrógeno. El pI de las proteínas se calculó a partir de una gráfica en la que



se representó el porcentaje de nitrógeno de los sobrenadantes (respecto al nitrógeno total extraído) frente a las diferentes unidades de pH.

### 6.3.13. Obtención de aislados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

A partir de la harina se extrajeron las proteínas en una relación 1:10 p/v con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.25 % (p/v) en medio básico durante 60 minutos a temperatura ambiente (Vioque *et al.*, 1999). Después de centrifugar el extracto a 8500 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante se recuperó y el sólido se extrajo de nuevo en relación 1:5 p/v en las mismas condiciones de la primera extracción. Los distintos sobrenadantes, una vez llevados a su punto isoeléctrico calculado (pI 4), se centrifugaron como se ha mencionado anteriormente. Ambos precipitados se lavaron con agua destilada al mismo pH con el que fueron obtenidos y se centrifugaron en las mismas condiciones comentadas anteriormente para eliminar los restos de sales y de otros compuestos no proteicos. Finalmente, las proteínas precipitadas fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente (Figura 16).



**Figura 16.** Proceso de obtención de aislados proteicos a partir de la harina desengrasada de *Amaranthus*

*hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

#### 6.3.14. Hidrólisis de proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Las hidrólisis se realizaron con el aislado proteico obtenido a pH 10.5.

Las distintas muestras proteicas fueron hidrolizadas en un reactor de hidrólisis con un volumen de 500 mL manteniéndose una agitación magnética suave durante todo el proceso hidrolítico. Después de ajustar la condiciones de ensayo de concentración de sustrato al 5%, pH 8 y 7 (pH óptimo de las enzimas Alcalasa® 2.4L y Flavorzima® 1000MG, y su relación enzima sustrato 0.3 UA/g y 50 ULAP/g, respectivamente) a 50° C (para evitar el crecimiento bacteriano), los derivados obtenidos de las distintas proteasas fueron inactivados y centrifugados a 8000 rpm durante 15 minutos recuperando el sobrenadante. Alícuotas de cada hidrólisis fueron tomadas a diferentes tiempos calculándose su grado de hidrólisis.

### 6.3.15. Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis, definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos respecto al total (Adler-Nissen, 1979), se calculó a partir de las determinaciones de grupos aminos libres que reaccionan con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$GH (\%) = (h/h_t) \times 100$$

siendo h: grupo de aminos libres procedentes del proceso hidrolítico

$h_t$ : grupos aminos totales del aislado proteico, tras hidrólisis total de la muestra.

Se prepara una solución patrón de L-leucina para la recta de calibrado tomando 5 mg y aforando a 25 mL con SDS 1% en un matraz.

Se toman X  $\mu$ L de muestra (o de solución patrón) y se completa hasta 125  $\mu$ L con SDS 1%. Después de eso se añade 1 mL de tampón fosfato sódico 0.2125 M pH 8.2 y 1 mL de TNBS 0.025%. Luego se incuba durante 1 hora a 50°C en un baño de agua y luego se añaden 2 mL de HCl 0.1 N, dejando reposar en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se mide su absorbancia a 420 nm.

### 6.3.16. Simulación gastrointestinal *in vitro* de los péptidos obtenidos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

El ensayo de simulación gastrointestinal está basado en el método descrito por Wang *et al.* (2008) con ligeras modificaciones. 400 mg de las fracciones proteicas y de la harina desengrasada fueron resuspendidas en 7.2 mL de una solución de NaCl 0.03 mol/L, ajustando el pH a 2.0, e incubando las suspensiones a 80°C durante 5 minutos, para finalmente dejar que las muestras se atemperen. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática secuencial empleando pepsina porcina previamente disuelta en una solución de NaCl 0.03 mol/L pH 2.0. Esta fue añadida en una relación 1:40 (gramos de enzima: gramos de fracción proteica o enzima/harina) y la suspensión se agitó a 37°C durante 3 horas. Después de eso, se ajustó el pH a 7.5 y una mezcla de tripsina y pancreatina (en una relación 1:1) fue disuelta en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 eqs/L, y se añadió a las muestras en una relación 1:40 (gramos de enzima: gramos de fracción proteica o enzima/harina) llevándolas a agitación a 37°C durante 3 horas. Por último, la reacción se detuvo calentando las muestras a 100°C durante 10 minutos, para posteriormente centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos y recuperar los sobrenadantes. Finalmente, se determina el grado de hidrólisis.

6.3.17. Digestibilidad *in vitro* de las proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. tras su incubación con proteasas digestivas

Con las muestras de harina desengrasada, aislado proteico e hidrolizado obtenido de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L., se toman 100 mg de cada una de ellas y se adicionan 7.5 mL de una disolución de pepsina 0.2 mg/mL preparada a partir de HCl 0.1 N. Se ajusta el pH a 2 y las muestras se incuban a 37°C durante 2 horas. Después de eso, se neutralizan con NaOH y se añaden 3.75 mL de una solución de pancreatina 0.5 mg/mL preparada con tampón fosfato sódico 0.2 M a pH8 y se incuba durante 2 horas a 37°C. Después de la incubación, se adicionan 5 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/v) y se centrifuga a 10000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recupera y se mide el volumen y la cantidad de nitrógeno en el mismo por el método de Kjeldahl (emplear preferiblemente 6 mL para la digestión). Los resultados de digestibilidad son expresados en porcentaje y se obtienen mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad} = \text{mg N solubles en el sobrenadante} \times 100 / \text{mg N iniciales}$$

### 6.3.18. Determinación de péptidos bioactivos

En el hidrolizado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L., se realizaron diversos ensayos *in vitro* para determinar la presencia de péptidos bioactivos.

#### 6.3.18.1. Péptidos con actividad antioxidante

##### 6.3.18.1.1 Capacidad para secuestrar el radical DPPH

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método de Wu *et al.*, (2003). El DPPH es un radical libre estable que presenta máxima absorbancia a 517 nm disuelto en etanol. Cuando el DPPH encuentra una sustancia donadora de protones, como un antioxidante, el radical puede ser secuestrado y, así, disminuye la absorbancia.

Para ello, 0.5 mL de muestra fueron añadidos a 0.5 mL de DPPH 0.1 mM en etanol 96%. La mezcla se agita e incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Como referencia se utiliza un blanco con agua, como control negativo una solución compuesta por 0.5 mL de agua y 0.5 mL de DPPH 0.1 mM y como control positivo una solución de 0.5 mL de 2,6-di-*tert*-butil-4-metil-fenol (BHT) disuelta en etanol 96 % (1 mg/mL) y 0.5 mL de DPPH 0.1 mM. Se mide la absorbancia a 517 nm en una cubeta de vidrio. Los ensayos se refirieron en % captación de DPPH ( $[\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}] \times 100 / \text{Abs blanco}$ ).

#### 6.3.18.1.2 Decoloración del $\beta$ -caroteno

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método de Miller (1971). El ensayo se basa en determinar la decoloración que sufre el  $\beta$ -caroteno por la acción de los productos de oxidación del ácido linoleico.

Para ello, 1 mL de una disolución 0.2 mg/mL de  $\beta$ -caroteno en cloroformo se añade a una mezcla de 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 20. A continuación, el cloroformo es eliminado en el rotavapor y se adicionan 50 mL de agua rica en oxígeno obtenida burbujeando oxígeno durante 15 minutos. Alícuotas de 250  $\mu$ L de esta mezcla se añaden a microplacas de 96 pocillos que contienen 10  $\mu$ L de las muestras cuya actividad antioxidante quiere ensayarse. Como referencia se utiliza un blanco con agua y como control positivo una solución de 2,6-di-*tert*-butil-4-metil-fenol (BHT) disuelta en etanol 96 % (0.1 mg/mL). Se mide la absorbancia a 470 nm y 45°C a tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos en lector de microplacas, para ir siguiendo la decoloración del  $\beta$ -caroteno. Una medida de la absorbancia a  $t = 0$ , que se tomó como referencia, se realiza inmediatamente después de añadir la emulsión a la solución antioxidante. Los ensayos se refirieron en % índice de protección ( $[Abs_{t=0} - Abs_{t=n}] \times 100 / Abs_{t=0}$ ) frente al tiempo (min).



### *6.3.18.1.3 Determinación del poder reductor*

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método de Oyaizu (1986). El ensayo se basa en determinar el aumento de absorbancia a 700 nm que sufre el ferricianuro en presencia de un antioxidante, el cual lo reduce a ferrocianuro, que al reaccionar con  $\text{Fe}^{3+}$  forma ferrocianuro ferrico (color verde).

Para ello, 100  $\mu\text{L}$  de muestra se añaden a una mezcla de 250  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 0.2 M pH 6.6 y 250  $\mu\text{L}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  al 1%. Se incuba la solución a 50 °C durante 20 minutos y luego se añaden 250  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10%. A continuación, se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se toman 500  $\mu\text{L}$  de la capa superior y se vierten en un microtubo que contiene 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  al 0.1%. Se deja reposar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta que se desarrolle el color y se mide absorbancia a 700 nm. Como referencia se utiliza un blanco con agua, como control negativo se sustituye la muestra por 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  y como control positivo se sustituye la muestra por 100  $\mu\text{L}$  de una solución de BHT disuelta en etanol 96% (0.1 mg/mL).

### 6.3.18.2. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

La actividad inhibidora de las distintas muestras se ensayó siguiendo el método de Sentandreu y Toldra (2006). La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) fue ensayada siguiendo el incremento de absorbancia a 420 nm que acompaña a la hidrólisis del sustrato sintético *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-*L*-phenylalanyl-*L*-proline (Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro).

- *Ensayos de actividad de la enzima convertidora de angiotensina*: este protocolo describe un ensayo fluorescente para medir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con alta precisión y sensibilidad. El método se basa en la capacidad de ECA para hidrolizar el sustrato fluorescente inmovilizado intramolecularmente (Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro). La generación del producto fluorescente *o*-aminobenzoilglicina puede monitorearse continuamente.

Primeramente, se realiza una solución stock de ECA de pulmón de conejo (A-6778 Sigma) resuspendiendo en glicerol al 50 % con 1 mL de Buffer A (Buffer Tris-Base 300 mM pH 8.3 con 2  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) para tener una concentración de una unidad/mL. Posteriormente, se diluye la solución stock de ECA con Buffer B (Buffer Tris-Base 150 mM pH 8.3) en una relación 1:24 (ECA:tampón). Se debe de preparar fresca el día del ensayo y esto representaría una concentración de 0.04 U/mL, lo que tendría una actividad enzimática de  $\approx$ 3 mU/mL. Además, se prepara una solución de trabajo del sustrato en Buffer C (Buffer Tris-Base 150 mM pH 8.3 con NaCl 1.125 M) la cual tenga una concentración de 0.45 mM. De igual forma, esta solución debe prepararse fresca el día del ensayo y evitar el contacto con la luz. El ensayo se llevo a cabo en un lector de

microplacas de fluorescencia Fluoroskan Ascent (Thermo Electron) con una longitud de excitación y emisión de 355 y 420 nm, respectivamente, bajo el siguiente procedimiento:

	Blanco	Control	B muestra	Muestra
40 $\mu$ L	Tampón B	ECA	Tampón B	ECA
40 $\mu$ L	Agua	Agua	Muestra	Muestra
160 $\mu$ L	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato

La mezcla se incubó a 37° C durante 60 minutos, realizando lecturas con intervalos de 15 minutos entre cada una de ellas. Los ensayos de inhibición enzimática se expresaron como % de inhibición respecto a la actividad total de ECA.

### 6.3.19. Análisis estadístico

Las variables observadas fueron sometidas a un Análisis de Varianza Simple empleando el software estadístico IBM SPSS Statistics 20<sup>®</sup>. Las comparaciones estadísticas de los valores promedio de las variables cuantificadas para cada experimento fueron realizadas empleando una prueba de Comparación Múltiple de Medias de Tukey ( $P < 0.05$ ; Zar, 1996). El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización química de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de la harina de *Amaranthus hypochondriacus* L. antes y después del proceso de desengrasado se muestran en la Tabla 5. Posterior a la extracción de aceite, el contenido proteico de la harina ha sido 15.02%, el cual oscila dentro de los valores reportados por **Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa (2012)**, quienes mencionan un contenido que va del 13 al 18% de proteína para distintas especies de amaranto.

**Tabla 5.** Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Análisis	Harina	Harina desengrasada
<b>Humedad (%)</b>	7.63 ± 0.092	9.19 ± 0.085
<b>Grasa (%)</b>	5.18 ± 0.114	0.25 ± 0.025
<b>Fibra (%)</b>	9.30 ± 0.563	11.95 ± 0.022
<b>Cenizas (%)</b>	20.63 ± 0.097	8.64 ± 0.448
<b>Proteínas (%)</b>	12.91 ± 0.815	15.02 ± 0.186
<b>Azúcares solubles (%)</b>	1.49 ± 0.001	1.66 ± 0.001
<b>Polifenoles (%)</b>	0.007 ± 0.001	0.009 ± 0.001
<b>*Otros</b>	42.853 ± 0.000	53.281 ± 0.000

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

\*Otros: principalmente almidón y pectinas

La composición aminoacídica de la fracción proteica de la harina antes y después de la extracción de aceite de *A. hypochondriacus* L. (Tabla 6) presenta un perfil equilibrado en la mayoría de los aminoácidos esenciales, e incluso estos valores son ligeramente superiores a los descritos por otros autores en esta misma especie (**Juan *et al.*, 2007**). De este modo, la calidad nutricional de las proteínas de las harinas de especies de *Amaranthus*, ha sido comparada con la proteína de otros vegetales como el trigo, el arroz, la avena y el maíz, presentando inclusive valores superiores a estos (**Grobelnik Mlakar *et al.*, 2009**). Esto representa un área de oportunidad para la obtención de productos proteicos de alto valor añadido a partir de este subproducto.

**Tabla 6.** Composición aminoacídica de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	8.166 ± 0.023	8.749 ± 0.118	
Glu + Gln	17.189 ± 0.093	17.279 ± 0.028	
Serina	7.563 ± 0.207	7.527 ± 0.172	
Histidina	3.072 ± 0.018	3.318 ± 0.003	1.9
Glicina	9.355 ± 0.109	8.456 ± 0.095	
Treonina	4.564 ± 0.065	4.273 ± 0.059	3.4
Arginina	9.636 ± 0.086	9.146 ± 0.097	
Alanina	4.251 ± 0.044	4.047 ± 0.094	
Prolina	0.312 ± 0.018	2.013 ± 0.001	
Tirosina	6.837 ± 0.185	6.498 ± 0.169	
Valina	4.073 ± 0.040	3.866 ± 0.078	3.5
Metionina	0.882 ± 0.001	1.204 ± 0.001	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	2.286 ± 0.044	2.286 ± 0.059	
Isoleucina	3.756 ± 0.034	3.512 ± 0.053	2.8
Leucina	6.867 ± 0.079	6.302 ± 0.107	6.6
Fenilalanina	4.978 ± 0.066	4.578 ± 0.069	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	6.764 ± 0.048	6.274 ± 0.110	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El componente mayoritario de las harinas de *A. hypochondriacus* L. se atribuye a la fracción de hidratos de carbono con un 53.28%, correspondiente principalmente a almidón y pectinas. Estos valores son ligeramente superiores a los reportados por **Ogrodowska et al. (2014)** para especies del mismo género con un 49.5%, pero inferiores de acuerdo con otros autores para la misma especie con un 67.9% (**Grobelnik Mlakar et al., 2009**). Por otra parte, se ha determinado el contenido de azúcares solubles con un 1.66% del total, siendo de suma importancia la reducción de este componente debido a que las denominadas reacciones de Maillard pueden disminuir la digestibilidad de las proteínas, así como la cantidad de lisina disponible, entre otros aminoácidos (**Badui, 2006**).

La fibra de la harina de *A. hypochondriacus* L. se encuentra en un porcentaje aproximado al 12% y es superior al observado por otros autores para la especie (**Grobelnik Mlakar et al., 2009**) y para el género (**Akubugwo et al., 2007**). **Schnetzler y Breene (1994)** describieron que la semilla oscura de amaranto contiene el doble de fibra dietética en comparación a la semilla pálida (16 y 8%, respectivamente), mientras que la tasa de fibra soluble es menor (18 respecto a 40%). Aunque en el presente estudio no se le puede atribuir del todo estos resultados a la coloración de la semilla, resulta interesante la forma en la que está se puede relacionar con el contenido de fibra y las implicaciones que conllevaría para la selección de la misma en futuras investigaciones.

El componente minoritario presente en la harina desengrasada de *A. hypochondriacus* L. son los polifenoles con un valor de 0.009%. De acuerdo a lo reportado por **Lopez-Mejia et al. (2014)**, mediante una extracción con Etanol al 100% se obtienen 0.18 equivalentes de ácido gálico (EAG)/g materia seca. Este valor representado en porcentaje no difiere respecto al resultado obtenido pese a que se

determino por una metodología distinta. **Barba de la Rosa et al. (2009)** identificaron y cuantificaron tres polifenoles (rutina, isoquecitrina y nicotiflorin) en cuatro variedades de harina de *A. hypochondriacus* L., los cuales tienen potenciales benéficos en la salud humana. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante, siendo correlacionada está con la presencia de rutina, ácido vanílico, ácido ferúlico y quercetina en muestras de vino de arroz (**Que et al., 2006**).

El contenido en materia grasa de la semilla de *A. hypochondriacus* L. en la harina fue de 5.18%, el cual es ligeramente inferior al reportado por otros autores para la misma especie (**Grobelnik Mlakar et al., 2009**) y similar para otras especies del género (**Palombini et al., 2013**). A pesar de que la semilla de *A. hypochondriacus* L. no es considerada oleaginosa, ha sido identificada como uno de los nuevos cultivos que pueden considerarse una rica fuente de escualeno (**Lehmann, 1996; Budin, et al., 1996; Sun, et al., 1997**). Por otra parte, tras el proceso de desengrasado se ha conseguido una harina con un 0.25% de grasa residual, siendo de gran relevancia tal reducción debido al papel que ejercen las grasas en la estabilidad y conservación de los alimentos.

El contenido en los ácidos grasos saturados mayoritarios, ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) y ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), representa cerca del 22% de la grasa total (18.78 y 3.59%, respectivamente) (Tabla 7). Estos valores son ligeramente inferiores a lo reportado por **Jahaniaval et al., (2000)** sobre el contenido de ácidos grasos saturados para la misma especie, así como ligeramente superiores a los descritos por **Palombini et al. (2013)** para el mismo género (Tabla 8), y para otros aceites comestibles de acuerdo con **Gunstone et al. (2007)**.

**Tabla 7.** Composición de ácidos grasos de *Amaranthus hypochondriacus* L.

A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	18.78 ± 0.1
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.34 ± 0.0
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	3.59 ± 0.2
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	25.97 ± 0.1
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	42.69 ± 0.2
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	0.96 ± 0.1
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.76 ± 0.0
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	0.25 ± 0.0
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.38 ± 0.1
A. Erúcico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

**Tabla 8.** Composición de ácidos grasos de *Amaranthus hypochondriacus* L. y de los principales aceites vegetales comestibles (Gunstone *et al.*, 2007)

		<i>A. hypochondriacus</i> L.	Girasol	Oliva	Palma	Soya
A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	18.78 ± 0.1	5.6 - 7.6	7.5 - 20.0	40.1 - 47.5	8.0 - 13.3
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.34 ± 0.0	0.0 - 0.3	0.3 - 3.5	0.0 - 0.6	0.0 - 0.2
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	3.59 ± 0.2	2.7 - 6.5	0.5 - 5.0	3.5 - 6.0	2.4 - 5.4
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	25.97 ± 0.1	14.0 - 39.4	55.0 - 83.0	36.0 - 44.0	17.7 - 26.1
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	42.69 ± 0.2	48.3 - 74.0	3.5 - 21.0	6.5 - 12.0	49.8 - 57.1
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	0.96 ± 0.1	0.0 - 0.2	< 1.5	0.0 - 0.5	5.5 - 9.5
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.76 ± 0.0	0.2 - 0.4	< 0.8	0.0 - 1.0	0.1 - 0.6
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	0.25 ± 0.0	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.38 ± 0.01	0.5 - 1.3	< 0.2	n.d.	0.3 - 0.7
A. Erúcico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3

Los resultados (mg/100 g) están expresados en porcentaje (%) como la media ± la desviación estándar  
n.d.: no detectado



El contenido en ácidos grasos poliinsaturados está determinado por el alto contenido en ácido linoleico con un 42.69%, característico de los pseudocereales en los cuales sus semillas y aceites son más ricos en omega 6, y por el bajo contenido en ácido linolenico con un 0.96%. **Jahaniaval et al., (2000)** describe valores muy similares para la misma especie, donde el contenido de ácido linoleico oscila de 39.4 a 49.1%, mientras que el ácido linolenico de 0.65 a 0.93%. Existe una relación inversa entre el contenido en ácido linoleico y ácido linolénico ya que se ha comprobado que el ácido linoleico y otros ácidos grasos omega 6 compiten con los omega 3 para formar parte de las membranas celulares. Otro factor de interés es que sus semillas prácticamente no tienen factores antinutricionales tan frecuentes como en las leguminosas. En lo que respecta al contenido de ácidos grasos monoinsaturados, el ácido oleico es ligeramente superior a lo descrito por algunos autores para la misma especie (**Jahaniaval et al., 2000**) e inferior para otras especies del mismo género (**Palombini et al., 2013**).

En lo que respecta a la harina de *Chenopodium quinoa* Willd., los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica antes y después del proceso de desengrasado se muestran en la Tabla 9. Tras la extracción de aceite, el contenido proteico de la harina ha sido 18.64%, el cual es ligeramente superior a lo observado por otros autores, quienes reportan valores que oscilan entre el 11 y el 17% para la misma especie (**Abugoch et al., 2008; Repo y Serna, 2011; Vega-Gálvez et al., 2010**), así como para seis ecotipos en distintas áreas geográficas de Chile (**Miranda, et al., 2012**). Este alto contenido proteico resalta la importancia del aprovechamiento de este subproducto para la obtención de aislados e hidrolizados proteicos.

**Tabla 9.** Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de *Chenopodium quinoa* Willd.

<b>Análisis</b>	<b>Harina</b>	<b>Harina desengrasada</b>
<b>Humedad (%)</b>	12.37 ± 0.04	9.82 ± 0.02
<b>Grasa (%)</b>	5.78 ± 0.21	3.00 ± 0.14
<b>Fibra (%)</b>	8.40 ± 0.06	7.13 ± 0.19
<b>Cenizas (%)</b>	5.44 ± 0.08	5.11 ± 0.10
<b>Proteínas (%)</b>	16.55 ± 0.03	18.64 ± 0.17
<b>Azúcares solubles (%)</b>	1.02 ± 0.00	1.28 ± 0.00
<b>Polifenoles (%)</b>	0.009 ± 0.00	0.024 ± 0.00
<b>*Otros</b>	50.4310 ± 0.00	54.9960 ± 0.00

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

\*Otros: principalmente almidón y pectinas

El perfil aminoacídico de la fracción proteica de la harina antes y después de la extracción de aceite de *C. quinoa* Willd. (Tabla 10) presenta una composición equilibrada en la mayoría de los aminoácidos esenciales, incluyendo la lisina, siendo estos valores similares a los descritos por otros autores en esta misma especie (**Koziol, 1992; Dini et al., 1992; Repo-Carrasco et al., 2003; Wright et al., 2002; González et al., 1989**). Por ello, la calidad nutricional de las proteínas de la harina de *C. quinoa* Willd., ha sido comparada con la de otros vegetales como el trigo, la avena, el centeno, la cebada y el maíz, presentando valores superiores a estos (**Valencia-Chamorro, 2003**).

**Tabla 10.** Composición aminoacídica de la harina desengrasada de *Chenopodium quinoa* Willd.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	7.782 ± 0.097	8.298 ± 0.219	
Glu + Gln	15.585 ± 0.000	16.108 ± 0.072	
Serina	5.435 ± 0.121	5.519 ± 0.049	
Histidina	3.354 ± 0.113	3.378 ± 0.046	1.9
Glicina	6.254 ± 0.288	6.665 ± 0.031	
Treonina	4.706 ± 0.178	4.487 ± 0.049	3.4
Arginina	10.323 ± 0.231	10.173 ± 0.060	
Alanina	4.389 ± 0.038	4.994 ± 0.050	
Prolina	4.452 ± 0.019	1.349 ± 0.000	
Tirosina	7.629 ± 0.176	6.381 ± 0.104	
Valina	6.102 ± 0.254	5.232 ± 0.000	3.5
Metionina	1.362 ± 0.031	1.412 ± 0.087	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	1.269 ± 0.032	1.520 ± 0.040	
Isoleucina	4.118 ± 0.084	4.195 ± 0.051	2.8
Leucina	7.761 ± 0.091	7.841 ± 0.090	6.6
Fenilalanina	5.143 ± 0.090	5.102 ± 0.125	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	6.445 ± 0.096	6.588 ± 0.071	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El componente mayoritario de la harina desengrasada de *C. quinoa* Willd. son los hidratos de carbono con un porcentaje de 54.99%, el cual es inferior a lo descrito por **Repo y Serna, (2011)** para distintas variedades de esta especie. Estas diferencias pueden atribuirse a la metodología empleada, puesto que **Ruales y Nair, (1994)** mencionan que el almidón de la quínoa se encuentra embebido en una matriz proteica, la cual reduce la velocidad de hidrólisis enzimática del almidón y, por tanto, es necesario un tratamiento con enzimas proteolíticas previo a la hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa, para la determinación no solo de su cantidad, sino también de su disponibilidad. En lo que respecta al contenido de azúcares solubles, esta presenta un 1.28% del total, valor de suma importancia puesto que un alto contenido de este podría modificar las propiedades funcionales de las

proteínas, así como ejercer un efecto negativo en la disponibilidad de ciertos aminoácidos (**Badui, 2006**).

La fibra de la harina de *C. quinoa* Willd. se encuentra en un porcentaje aproximado al 7% y es ligeramente superior a lo observado por otros autores para la misma especie (**Repo y Serna, 2011; Koziol, 1992; Dini et al., 1992; De Bruin, 1963**). De acuerdo con **Gualberto et al., (1997)** que describe el efecto del proceso de cocción y extrusión sobre el contenido de fibra dietética insoluble respecto a la soluble, estas ligeras diferencias pueden atribuirse a que la exposición a una alta temperatura causa la rotura de enlaces químicos creando partículas más pequeñas las cuales son mas solubles, ocasionando por tanto una transformación de algunos componentes de fibra insolubles en fibra solubles durante dichos procesos.

Con aproximadamente un 0.024%, el componente minoritario presente en la harina desengrasada de *C. quinoa* Willd. son los polifenoles. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores para la misma especie (**Palombini et al., 2013**) y para diferentes variedades de la misma (**Repo y Serna, 2011**). De acuerdo con lo observado por **Dewanto, Wu y Hai Liu (2002)**, el contenido de compuestos fenólicos totales aumentan durante el proceso térmico, tal y como se describió con la fibra. Estos investigadores han demostrado que el aumento de la actividad antioxidante total se relaciona con el aumento de los compuestos fenólicos solubles liberados durante el proceso térmico, siendo que los compuestos fenólicos en los cereales se pueden encontrar libres, esterificados o unidos en formas insolubles.

El contenido en materia grasa de la semilla de *C. quinoa* Willd. fue de 5.78%, el cual es ligeramente inferior al reportado por otros autores para la misma especie (**Repo y Serna, 2011; Miranda, et al., 2012; Koziol, 1992; Dini et al., 1992; De Bruin, 1963;**

**Wright et al., 2002**). Pese a no ser considerada como una semilla oleaginosa, su contenido de aceite se encuentra por encima del de algunos cereales. Tras el proceso de extracción de aceite se ha conseguido una harina con un 3% de grasa residual, siendo de suma importancia este valor puesto que un alto contenido puede ejercer un efecto negativo en la estabilidad de la misma.

El contenido mayoritario de ácidos grasos saturados, el ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) y el ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), representa cerca del 10% de la grasa total (9.50 y 0.73%, respectivamente) (Tabla 11). Estos valores son ligeramente superiores a lo reportado por **Palombini et al. (2013)** sobre el contenido de ácidos grasos saturados para la misma especie (Tabla 12), así como para otros aceites comestibles (**Gunstone et al., 2007**).

**Tabla 11.** Composición de ácidos grasos de *Chenopodium quinoa* Willd.

A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	9.50 ± 0.0
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.00 ± 0.0
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	0.73 ± 0.2
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	21.66 ± 0.0
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	48.60 ± 0.1
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	6.54 ± 0.0
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.36 ± 0.0
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	1.33 ± 0.1
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.51 ± 0.01
A. Erúcico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

**Tabla 12.** Composición de ácidos grasos de *Chenopodium quinoa* Willd. y de los principales aceites vegetales comestibles (Gunstone *et al.*, 2007)

		<i>C. quinoa</i> Willd.	Girasol	Oliva	Palma	Soya
A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	9.50 ± 0.0	5.6 - 7.6	7.5 - 20.0	40.1 - 47.5	8.0 - 13.3
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.3	0.3 - 3.5	0.0 - 0.6	0.0 - 0.2
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	0.73 ± 0.2	2.7 - 6.5	0.5 - 5.0	3.5 - 6.0	2.4 - 5.4
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	21.66 ± 0.0	14.0 - 39.4	55.0 - 83.0	36.0 - 44.0	17.7 - 26.1
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	48.60 ± 0.1	48.3 - 74.0	3.5 - 21.0	6.5 - 12.0	49.8 - 57.1
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	6.54 ± 0.0	0.0 - 0.2	< 1.5	0.0 - 0.5	5.5 - 9.5
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.36 ± 0.0	0.2 - 0.4	< 0.8	0.0 - 1.0	0.1 - 0.6
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	1.33 ± 0.1	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.51 ± 0.01	0.5 - 1.3	< 0.2	n.d.	0.3 - 0.7
A. Erúxico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3

Los resultados (mg/100 g) están expresados en porcentaje (%) como la media ± la desviación estándar  
n.d.: no detectado

El contenido en ácidos grasos insaturados (fracción nutritiva y de alta calidad, basado en el hecho de que tiene un alto grado de insaturación, con un índice de 3.9 a 4.7) está determinado por el alto contenido en ácido linoleico con un 48.60%, seguido por el ácido oleico con un 21.66%, y por un bajo contenido en ácido linolénico con un 6.54%. Estos valores son bastante similares a los reportados por distintos autores para la misma especie (Koziol, 1992; Repo-Carrasco *et al.*, 2003; Ruales y Nair, 1994; Palombini *et al.*, 2013), quienes describen con un 48-53%, 22-29% y 4-8%, el contenido en ácido linoleico, oleico y linolénico, respectivamente. El ácido linoleico (C<sub>18:2</sub>) es uno de los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes identificados en esta especie. Además, todos los ácidos grasos presentes en la quínoa se encuentran bien protegidos por la presencia de la vitamina E, la cual actúa como un antioxidante natural (Ng, *et al.*, 2007).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la harina de *Salvia hispanica* L. antes y después del proceso de desengrasado se muestran en la Tabla 13. Tras la extracción de aceite, el contenido proteico de la harina fue 31.76%, el cual es superior a los reportes realizados por otros autores para la especie, quienes mencionan valores que van del 21 al 25% de proteína (Marineli *et al.*, 2014; Segura-Campos *et al.*, 2014; Sargi *et al.*, 2013).

**Tabla 13.** Caracterización fisicoquímica de la harina desengrasada de *Salvia hispanica* L.

Análisis	Harina	Harina desengrasada
<b>Humedad (%)</b>	5.99 ± 0.02	1.32 ± 0.03
<b>Grasa (%)</b>	37.82 ± 0.09	5.1 ± 0.15
<b>Fibra (%)</b>	25.40 ± 0.01	49.39 ± 0.46
<b>Cenizas (%)</b>	5.24 ± 0.04	7.22 ± 0.08
<b>Proteínas (%)</b>	19.64 ± 0.05	31.76 ± 0.09
<b>Azúcares solubles (%)</b>	5.86 ± 0.01	5.12 ± 0.05
<b>Polifenoles (%)</b>	0.0167 ± 0.01	0.0399 ± 0.01
<b>*Otros</b>	0.0333 ± 0.00	0.0501 ± 0.00

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

\*Otros: principalmente almidón y pectinas

El perfil de aminoácidos de la fracción proteica de la harina antes y después de la extracción de aceite de *S. hispanica* L. (Tabla 14) presenta una composición equilibrada en la mayoría de los aminoácidos esenciales, incluyendo a la lisina. Estos valores son bastante similares a los descritos por otros autores en esta misma especie (Melo-Ruíz *et al.*, 2016; Nitrayová *et al.*, 2014). Por consiguiente, la calidad nutricional de las

proteínas de la harina de *Salvia hispanica* L., pudiera compararse con la de otros vegetales como el trigo, el arroz y el maíz (Koziol, 1992), y ser el preámbulo para el aprovechamiento de este subproducto con la finalidad de obtener productos proteicos de alto valor añadido.

**Tabla 14.** Composición aminoacídica de la harina desengrasada de *Salvia hispanica* L.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	7.238 ± 0.076	8.555 ± 0.118	
Glu + Gln	17.467 ± 0.133	18.038 ± 0.048	
Serina	6.237 ± 0.032	6.639 ± 0.029	
Histidina	3.085 ± 0.091	3.314 ± 0.092	1.9
Glicina	4.881 ± 0.091	5.789 ± 0.085	
Treonina	3.848 ± 0.065	4.366 ± 0.045	3.4
Arginina	9.808 ± 0.003	10.465 ± 0.006	
Alanina	4.783 ± 0.010	5.582 ± 0.034	
Prolina	0.625 ± 0.004	2.237 ± 0.000	
Tirosina	6.043 ± 0.094	5.531 ± 0.094	
Valina	4.540 ± 0.092	4.403 ± 0.078	3.5
Metionina	0.904 ± 0.039	1.516 ± 0.000	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	2.712 ± 0.003	2.376 ± 0.034	
Isoleucina	4.099 ± 0.073	3.359 ± 0.052	2.8
Leucina	7.868 ± 0.070	7.261 ± 0.135	6.6
Fenilalanina	6.166 ± 0.022	5.505 ± 0.097	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	5.519 ± 0.060	5.166 ± 0.094	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El componente mayoritario de la harina desengrasada de *S. hispanica* L. se atribuye a la fibra con un 49.39%. Ayerza y Coates, (1999), describen que la harina desengrasada de chía tiene contenidos de fibra y proteína similares a los de otras semillas oleaginosas utilizadas actualmente en la industria alimentaria (22 g y 17 g / 100 g, respectivamente), lo cual lo convierte en un subproducto de gran interés en el área de



investigación. El valor obtenido de la harina desengrasada es bastante superior a lo descrito por otros autores para esta especie (**Marineli et al., 2014; Segura-Campos et al., 2014; Melo-Ruíz et al., 2016**), quienes mencionan valores aproximadamente del 24-37%, pero inferior a lo reportado por **Vázquez-Ovando et al., (2009)** sobre el contenido de fibra dietaria total, describiendo valores cercanos al 57%. Por otra parte, es importante mencionar que este alto contenido de fibra puede influir negativamente en la digestibilidad de las proteínas, así como en la disponibilidad de ciertos minerales (**Bell, 1993**).

En lo que respecta al contenido de azúcares solubles, la harina desengrasada presenta 5.12% del total, siendo un valor que difiere significativamente con lo reportado por **Melo-Ruíz et al. (2016)** con un valor cercano al 20%, pero muy similar a lo descrito por **Segura-Campos et al. (2014)** con un 1.51%. Como se ha mencionado anteriormente, el reducir el contenido de los azúcares resulta de gran importancia para que la digestibilidad de las proteínas no se vea afectada, evitando con esto que ocurran las reacciones de Maillard (**Badui, 2006**).

El componente minoritario presente en la harina desengrasada de *S. hispanica* L. son los polifenoles con un valor de 0.0399%. De acuerdo a lo reportado por **Reyes-Caudillo et al. (2008)**, emplearon dos diferentes métodos de extracción para determinar el contenido total de compuestos fenólicos. Estos investigadores han obtenido valores que oscilan entre 0.757 y 0.881 expresados en EAG/g materia seca. Por su parte, **Marineli et al., (2014)** describe 0.94 EAG/g materia seca para la misma especie, además de identificar la presencia de algunos compuestos fenólicos en la semilla, tales como quercetina, ácido clorogénico, miricetina y ácido decarboximetil elenólico unido a hidroxitirisol (3,4-DHPEA-EDA) a los cuales se les atribuye actividad antioxidante.

Estos valores son superiores a los obtenidos en el estudio, diferencias que pudieran deberse a las metodologías de extracción empleadas, pérdidas que ocurren durante su procesamiento e incluso al sitio de origen de la semilla, afectando de forma significativa la concentración de estos compuestos bioactivos (**Ayerza y Coates, 2011**).

El contenido en materia grasa de la semilla de *S. hispanica* L. fue de 37.82%, el cual es ligeramente superior al reportado por otros autores para la misma especie (**Silva et al., 2016; Ayerza, R., 2011; Marineli et al., 2014; Segura-Campos et al. 2014; Melo-Ruíz et al., 2016**) quienes describen valores entre el 25-35%. De acuerdo con esto, múltiples investigaciones sustentan el hecho de que esta especie pueda ser recomendada para emplearse en alimentación humana gracias al alto contenido de ácidos grasos, además de su contenido de proteínas, antioxidantes y fibra dietaria, los cuales son benéficos para la salud (**Marineli et al., 2014**). Por otra parte, tras el proceso de desengrasado se ha conseguido una harina con un 5.1% de grasa residual.

El contenido mayoritario en ácidos grasos saturados, ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) y ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), representa cerca del 11% de la grasa total (6.88 y 4.13%, respectivamente) (Tabla 15). Estos valores son bastante similares con lo reportado por otros autores (**Marineli et al., 2014; Melo-Ruíz et al., 2016; Nitrayová et al., 2014**), pero ligeramente inferiores a lo descrito por **Silva et al. (2016)** y **Ayerza (2011)**, quienes evaluaron el efecto que ejerce el uso de diferentes solventes, así como el empleo de semillas de diferentes localidades, sobre el perfil de ácidos grasos.

**Tabla 15.** Composición de ácidos grasos de *Salvia hispanica* L.

A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	6.88 ± 0.1
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.00 ± 0.0
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	4.13 ± 0.1
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	8.23 ± 0.1
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	19.39 ± 0.2
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	54.66 ± 0.1
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.56 ± 0.0
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	0.00 ± 0.0
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.00 ± 0.0
A. Erúcico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El contenido en ácidos grasos poliinsaturados está determinado por el alto contenido en ácido linolénico con un 54.66%. Se ha demostrado que la chía es una de las fuentes de omega-3 más eficientes para enriquecer alimentos (Ayerza y Coates, 2001). Este valor es inferior a lo descrito por otros autores (Segura-Campos *et al.* 2014; Marineli *et al.*, 2014; Melo-Ruíz *et al.* 2016; Nitrayová *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Ayerza y Coates, 2011), quienes describen valores entre 62-68%. Estas variaciones en la concentración de ácidos grasos en la semilla de chía pueden atribuirse a diversos factores, siendo el área de cultivo de la misma uno de los más influyentes. Ali *et al.* (2012), describe que las diferencias en el medio ambiente, los cambios climáticos, la disponibilidad de nutrientes, el año de cultivo o las condiciones del suelo, juegan un papel crucial en dichas variaciones. En otro estudio, se estableció la existencia de una relación inversa entre la altitud y el contenido de ácidos grasos saturados, siendo que a baja altura, se observó un aumento en la saturación de ácidos grasos en áreas con alta

temperatura (**Ayerza, 2010**). Además, se ha demostrado que la temperatura contribuye en gran medida al tipo de ácido graso que se pueda encontrar en el aceite, dado que durante la etapa del desarrollo de las semillas (durante abril a mayo), un aumento en la temperatura del medio ambiente ocasionó una disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (**Ayerza, 1995**). Otro factor que puede contribuir a las diferencias encontradas en la composición química de la semilla es la etapa de desarrollo de la planta, ya que se ha demostrado que el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico disminuyó en un 23% de la etapa inicial a la etapa de maduración de la semilla (**Peiretti y Gai, 2009**). En cuanto al contenido de ácido linoleico y ácido oleico, estos presentan un 19.39 y 8.23%, respectivamente, los cuales son bastante similares al descrito por algunos autores (**Silva et al., 2016; Sargi et al., 2013; Melo-Ruíz et al. 2016; Nitrayová et al., 2014; Marineli et al., 2014; Ayerza y Coates, 2011**), quienes mencionan valores cercanos al 20% para el ácido linoleico y entre el 6-7% para el ácido oleico. Por sus amplios beneficios para la salud, el perfil de ácidos grasos de *S. hispanica* L. (Tabla 16) se ha comparado con el de otros aceites comestibles (**Gunstone et al., 2007**).

**Tabla 16.** Composición de ácidos grasos de *Salvia hispanica* L. y de los principales aceites vegetales comestibles (Gunstone *et al.*, 2007)

		<i>S. hispanica</i> L.	Girasol	Oliva	Palma	Soya
A. Palmítico	(C <sub>16:0</sub> )	6.88 ± 0.1	5.6 - 7.6	7.5 - 20.0	40.1 - 47.5	8.0 - 13.3
A. Palmitoleico	(C <sub>16:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.3	0.3 - 3.5	0.0 - 0.6	0.0 - 0.2
A. Esteárico	(C <sub>18:0</sub> )	4.13 ± 0.1	2.7 - 6.5	0.5 - 5.0	3.5 - 6.0	2.4 - 5.4
A. Oleico	(C <sub>18:1</sub> )	8.23 ± 0.1	14.0 - 39.4	55.0 - 83.0	36.0 - 44.0	17.7 - 26.1
A. Linoleico	(C <sub>18:2</sub> )	19.39 ± 0.2	48.3 - 74.0	3.5 - 21.0	6.5 - 12.0	49.8 - 57.1
A. Linolénico	(C <sub>18:3</sub> )	54.66 ± 0.1	0.0 - 0.2	< 1.5	0.0 - 0.5	5.5 - 9.5
A. Araquídico	(C <sub>20:0</sub> )	0.56 ± 0.0	0.2 - 0.4	< 0.8	0.0 - 1.0	0.1 - 0.6
A. Gadoleico	(C <sub>20:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3
A. Behénico	(C <sub>22:0</sub> )	0.00 ± 0.0	0.5 - 1.3	< 0.2	n.d.	0.3 - 0.7
A. Erúcico	(C <sub>22:1</sub> )	0.00 ± 0.0	0.0 - 0.2	n.d.	n.d.	0.0 - 0.3

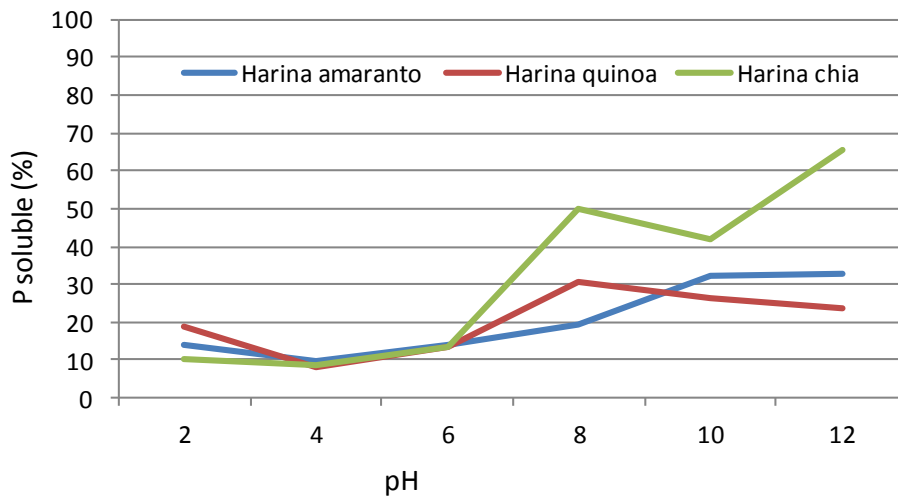
Los resultados (mg/100 g) están expresados en porcentaje (%) como la media ± la desviación estándar  
n.d.: no detectado

### 7.1.1. Propiedades funcionales de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Para determinar el potencial de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. como componente que puede mejorar las propiedades funcionales de un alimento, se evaluaron algunas de sus propiedades tecno-funcionales como solubilidad, absorción de agua y aceite, capacidad gelificante y de hinchamiento, así como capacidad y estabilidad emulsificante y espumante.

Una de las características más importantes y que puede llegar a afectar directamente a las propiedades tecno-funcionales de un material es su solubilidad, la cual está relacionada con el equilibrio hidrofílico-hidrofóbico de las proteínas y con la termodinámica de su interacción con el disolvente. En la Figura 17, se muestra el comportamiento de la solubilidad proteica de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. frente al pH, donde a pH neutro o ácido es sumamente baja, y esta va en aumento conforme el pH se vuelve más básico. De acuerdo con la composición proximal de las harinas desengrasadas evaluadas, el carácter heterogéneo de estas puede generar interacciones entre la fracción proteica y sus demás componentes, lo cual puede llegar a afectar tanto a la carga neta como a la hidrofobicidad del conjunto proteico, influyendo directamente en su solubilidad. Estos resultados son inferiores a los descritos por **Ogunbenle (2003)** y **Oshodi et al. (1999)**, quienes estudiaron la solubilidad proteica de la harina de quínoa con respecto al pH y obtuvieron valores entre el 15 y el 52%, donde los valores menores

de solubilidad corresponden al pH 6 y los valores mas elevados al pH 10. Partiendo de ello, los valores de solubilidad de la harina desengrasada de quínoa en la región ácida de pH implica que las proteínas pueden ser utilizadas para la elaboración de bebidas, sopas deshidratadas y salsas, entre otros. No obstante, el método de desengradado de la harina puede incluso afectar la configuración y estructura fisicoquímica de las proteínas ocasionando una baja solubilidad proteica.



**Figura 17.** Solubilidad proteica de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

En la Tabla 17, se muestran los resultados del resto de las propiedades tecnofuncionales de las harinas desengrasadas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L., presentando valores aceptables de absorción de agua para el amaranto y la quínoa, y absorción de aceite para la chía. Por otra parte, no se observa actividad emulsificante ni espumante relevante en ninguna harina.

**Tabla 17.** Propiedades tecnofuncionales de la harina desengrasada de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

	Amaranto	Quínoa	Chía
Absorción de agua (%)	220.00 ± 0.00	240.00 ± 0.00	No Aplica
Absorción de aceite (%)	162.83 ± 0.53	162.71 ± 9.88	252.47 ± 5.10
Actividad emulsificante (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Estabilidad emulsificante (%)	-	-	-
Capacidad de hinchamiento (mL/g)	5.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	No Aplica
Capacidad gelificante (+/-)	++	+++	++++
Capacidad espumante (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	<b>Tiempo</b>		
Estabilidad espumante (%)	<b>15'</b>	-	-
	<b>30'</b>	-	-
	<b>60'</b>	-	-
	<b>120'</b>	-	-

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

Los valores de capacidad de absorción de agua son superiores a los descritos por **Ogungbenle (2003)** y **Ogungbenle et al. (2009)** quienes reportaron 147% para la harina de quínoa. Por otra parte, estos mismos autores mencionan que la harina de quínoa no es un buen agente gelificante, la cual requiere de la adición de pequeñas concentraciones de sales para mejorar la formación del gel. En lo que respecta a la actividad espumante, **Ogungbenle (2003)** describió valores sumamente bajos, cercanos al 9% con una estabilidad del 4%, por lo que no representa una buena opción como agente espumante. En cambio, la actividad emulsificante reportada por estos autores alcanzó valores del 104% con una estabilidad del 45%, lo cual es sumamente superior a lo obtenido. Por último, la capacidad de absorción de aceite es superior a la descrita por estos autores, quienes obtuvieron un 46%, y disminuye conforme aumenta la concentración de sales, razón por la cual se justifican los valores obtenidos. Estos valores de absorción de agua y



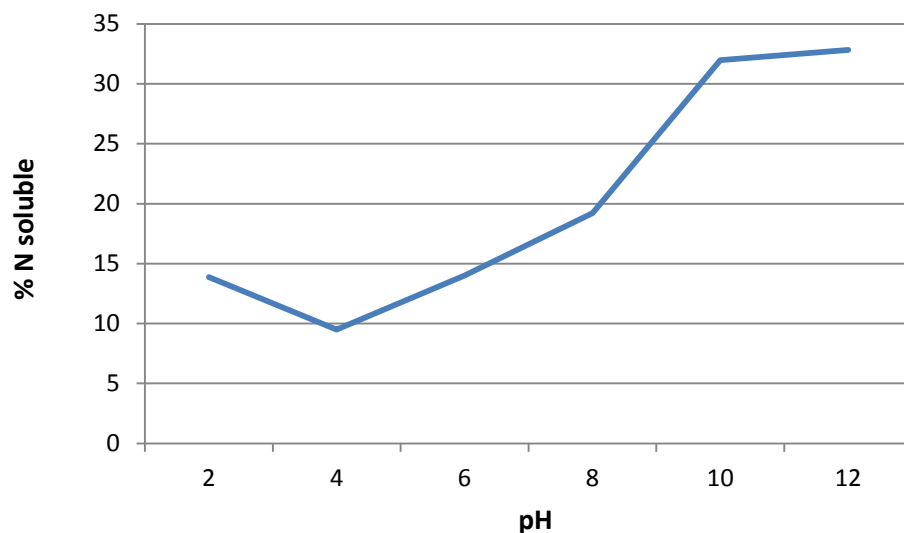
aceite resaltan el empleo de estas materias para ser utilizadas en la formulación de bebidas, salsas, postres y salchichas.

Resulta importante recalcar que no puede ser considerada la fracción proteica como la única responsable de las propiedades funcionales observadas. En este sentido, estudios realizados sobre el efecto de los polifenoles en las propiedades funcionales concluyeron que intervienen en la estabilización de los complejos proteína-proteína de  $\beta$ -lactoglobulina en las interfaces agua-aire aumentando la capacidad y estabilidad espumante frente a la acción de surfactantes. Los polifenoles también son responsables de la disminución de la solubilidad proteica al ocasionar la precipitación de estas debido al aumento de la hidrofobicidad del complejo proteína-polifenol (**Sarker *et al.*, 1995**). Por tanto, resulta complicado el aseverar que el contenido proteico de la harina es el único responsable del desarrollo de las propiedades funcionales y que partiendo de un material tan heterogéneo los otros componentes no proteicos no influyan sobre cada propiedad funcional.

## 7.2. Obtención de aislados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Previo a la obtención de los aislados proteicos a partir de la harina desengrasada de cada una de las especies (*Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.), se determinó el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas contenidas en ellas.

El menor porcentaje de nitrógeno soluble en *A. hypochondriacus* L. se observó a pH 4 (Figura 18). Este valor es similar al descrito por **Cordero de los Santos, et al. (2005)** para la misma especie, quien obtuvo un contenido proteico de 56.40% empleando un pH de precipitación de 4.5. Por otra parte, en comparación a lo observado por otros autores en distintas especies del género, este resultado es ligeramente superior, puesto que mencionan valores que van de un 15-50% de proteínas solubles bajo diferentes pH's de extracción y precipitación (**Acosta et al., 2016; Salcedo-Chávez, et al., 2002; Srivastava y Roy, 2011**). Cabe resaltar el papel que ejerce la solubilidad en la funcionalidad de las proteínas, puesto que durante los procesos de extracción y precipitación, que para las proteínas vegetales se suele tener un único punto isoeléctrico que oscila entre el pH 4-5, generalmente ocurren cambios en la misma, comúnmente atribuidos al pH y a la temperatura, pero también relacionados con el estado fisicoquímico de las moléculas proteicas y de la técnica de aislamiento empleada (**Vani y Zayas, 1995**). La obtención de los aislados proteicos se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.13 de Métodos.



**Figura 18.** Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de *A. hypochondriacus* L.

Los balances de materia y de proteína obtenidos durante la solubilización alcalina de las proteínas a pH 10.5 y su posterior precipitación isoeléctrica a pH 4 de *Amaranthus hypochondriacus* L. se presentan en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina de *A. hypochondriacus* L.

	<b>Balance de materia (mg)</b>	<b>Balance de proteínas (mg)</b>
Sobrenadante 1	1283.5 ± 0.1	520.14 ± 0.1
Sobrenadante 2	95.0 ± 0.0	24.31 ± 0.1
Sobrenadante 3	1491.2 ± 0.1	214.79 ± 0.1
Aislado proteico	522.8 ± 0.1	467.0 ± 0.1
Extracción proteica	31.09%	

Los datos están expresados en mg respecto al contenido total de materia y de proteína de la harina

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El rendimiento de solubilidad observado oscila alrededor del 36%, mientras que el rendimiento de precipitación se encuentra cercano al 90%. De acuerdo con estos datos, el porcentaje de recuperación de la proteína de partida es aproximado al 31%. Sin duda, el rendimiento deficiente de extracción proteica es reflejo de la baja solubilidad presente, la cual puede atribuirse a que durante el proceso de molienda no se ha conseguido mantener uniforme el tamaño de partícula de la harina de partida, ocasionando con esto que gran parte de las proteínas no puedan extraerse eficientemente, a lo que adicionalmente se agrega una pérdida considerable de proteínas existente durante su precipitación. Estos valores son ligeramente inferiores a lo reportado por otros autores que han empleado el mismo procedimiento de extracción en otras especies vegetales (Gonçalves *et al.*, 1997; Villanueva *et al.*, 1999), lo cual puede deberse a lo antes mencionado, así como a la presencia de un mayor contenido de albuminas en la harina de *A. hypochondriacus* L.

Una de las características que diferencia un aislado proteico de la harina desengrasada de partida es el incremento en su contenido proteico (Tabla 19).

El aislado presenta una riqueza proteica próxima al 90% en materia seca, lo cual representa un incremento de casi seis veces el contenido de proteína de la harina desengrasada. Además, puede observarse como los demás componentes no proteicos han disminuido considerablemente, lo cual contribuye en gran forma a que la digestibilidad de las proteínas no se vea afectada.

**Tabla 19.** Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L.

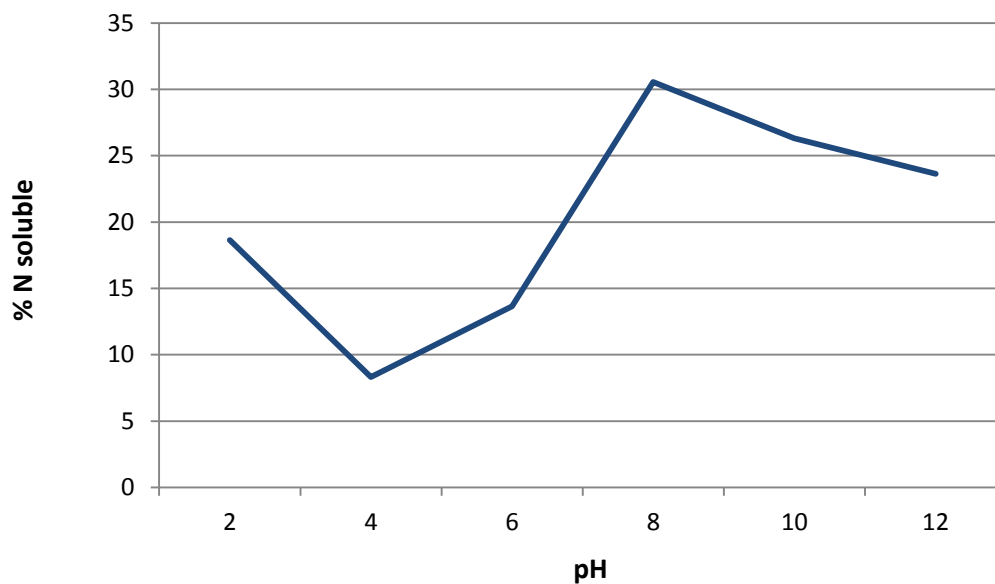
Análisis	Aislado proteico
<b>Humedad (%)</b>	2.34 ± 0.040
<b>Grasa (%)</b>	0.01 ± 0.001
<b>Fibra (%)</b>	3.97 ± 0.067
<b>Cenizas (%)</b>	2.09 ± 0.177
<b>Proteínas (%)</b>	89.25 ± 0.918
<b>Azúcares solubles (%)</b>	0.52 ± 0.001
<b>Polifenoles (%)</b>	0.011 ± 0.001
<b>*Otros</b>	1.809 ± 0.000

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

\*Otros: principalmente almidón y pectinas

Con respecto a *C. quinoa* Willd., el porcentaje menor de solubilidad proteica se observó a pH 4 (Figura 19). Este resultado es similar al reportado por **Abugoch, et al. (2008)** para la misma especie, quien obtuvo una solubilidad cercana al 10% empleando un rango de pH de precipitación entre 3-4. Por otra parte, con un pH de extracción de 10.5, se obtuvo una solubilidad cercana al 25%, siendo este valor ligeramente superior al reportado por estos autores al emplear un extracto proteico obtenido a pH 11, el cual es próximo al 22%, mientras que es inferior al mostrado empleando un extracto proteico a pH 9, con el cual han conseguido solubilizar la proteína casi hasta un 77% (**Abugoch, et al., 2008**). Se ha demostrado que las proteínas extraídas a pH alcalino tienen una preponderancia de especies cargadas negativamente debido a la ionización de los grupos carboxilo y la desprotonación de los grupos amina, un fenómeno que mejora la interacción proteína-disolvente. De aquí que la repulsión electrostática resultante entre

las proteínas de carga similar las mantiene separadas y estimula su interacción con el disolvente, aumentando de este modo la solubilidad de la proteína (Lawal, 2004). De acuerdo a lo anterior, Valenzuela *et al.* (2013) evaluaron el efecto del pH alcalino en la extracción proteica de *C. quinoa* Willd., y observaron que conforme hay un aumento en el pH ocurre lo mismo con la solubilidad proteica. Por ello, entre los factores que pudieron influir en los resultados obtenidos de solubilidad proteica se encuentran el pH de extracción empleado, la naturaleza de las proteínas de quínoa, así como el tamaño de partícula de la harina desengrasada de partida. La obtención de los aislados proteicos se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.13 de Métodos.



**Figura 19.** Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de *C. quinoa* Willd.

Los balances de materia y de proteína obtenidos durante la solubilización alcalina de las proteínas de *Chenopodium quinoa* Willd. a pH 10.5 y su posterior precipitación isoeléctrica a pH 4 se presentan en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina de *C. quinoa* Willd.

	<b>Balance de materia</b>	<b>Balance de proteínas</b>
Sobrenadante 1	1130.9 ± 0.1	498.26 ± 0.1
Sobrenadante 2	331.5 ± 0.0	70.44 ± 0.1
Sobrenadante 3	1046.63 ± 0.1	279.4 ± 0.1
Aislado proteico	548.5 ± 0.1	392.0 ± 0.1
Extracción proteica	20.88%	

Los datos están expresados en mg respecto al contenido total de materia y de proteína de la harina

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El rendimiento de solubilidad observado se aproxima al 28%, mientras que el rendimiento de precipitación se encuentra alrededor del 70%. De acuerdo con estos datos, el porcentaje de recuperación de la proteína de partida es cercano al 21%. Estos valores son inferiores a lo descrito por otros autores que han utilizado el mismo procedimiento de extracción en otras especies vegetales (**Gonçalves *et al.*, 1997; Villanueva *et al.*, 1999**). Tal déficit, como se mencionó anteriormente, puede deberse al pH de extracción, el tamaño de partícula de la harina desengrasada, así como a la presencia de un mayor contenido de albuminas en la harina de *C. quinoa* Willd.

Una de las características distintivas de un aislado proteico es el incremento en el contenido de proteínas de este respecto a la harina desengrasada (Tabla 21).

**Tabla 21.** Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de *C. quinoa* Willd.

<b>Análisis</b>	<b>Aislado proteico</b>
<b>Humedad (%)</b>	4.06 ± 0.044
<b>Grasa (%)</b>	1.087 ± 0.004
<b>Fibra (%)</b>	10.68 ± 0.193
<b>Cenizas (%)</b>	5.79 ± 0.088
<b>Proteínas (%)</b>	71.50 ± 0.792
<b>Azúcares solubles (%)</b>	3.18 ± 0.000
<b>Polifenoles (%)</b>	0.010 ± 0.000
<b>*Otros</b>	3.693 ± 0.000

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

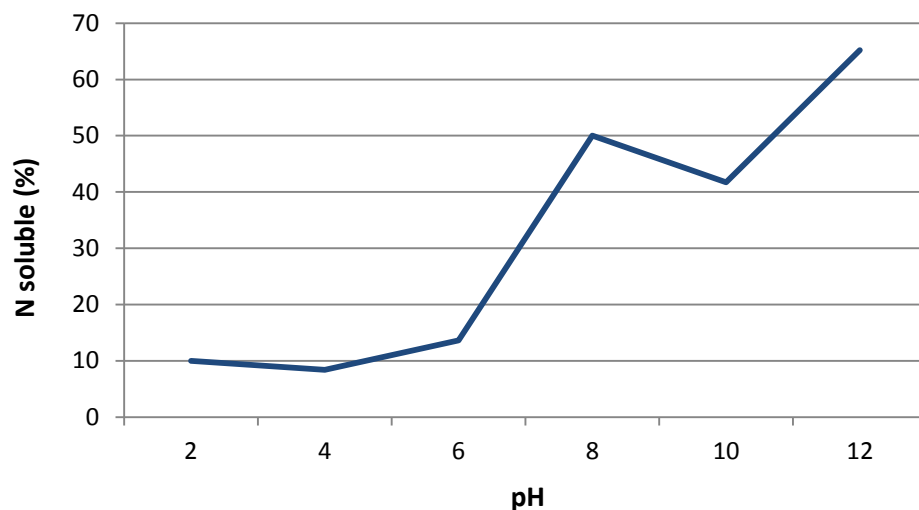
\*Otros: principalmente almidón y pectinas

El aislado presenta una riqueza proteica en torno al 70% en materia seca, lo cual representa un incremento de casi cuatro veces el contenido de proteína de la harina desengrasada. Además, puede observarse como la mayoría de los demás componentes no proteicos han disminuido considerablemente, con excepción de la fibra, la cual pudiera afectar la digestibilidad de las proteínas.

Al igual que en las especies descritas anteriormente, se observó el menor porcentaje de solubilidad proteica en *S. hispanica* L. a pH 4 (Figura 20). Esto en concordancia con lo observado por **Vázquez-Ovando et al. (2013)**, quienes describen valores ligeramente superiores a lo obtenido, donde el menor porcentaje de solubilidad se presenta a pH 4 con un 11.71%, y el mayor porcentaje de solubilidad a pH 10 con un 60.01%. Estos porcentajes de solubilidad, baja a pH ácido y alta a pH alcalino, se atribuye a la alta interacción hidrofílica de las proteínas de *S. hispanica* L. Otros autores



evaluaron el contenido de proteína en función del pH de extracción y de precipitación de aislados proteicos de *S. hispanica* L. y mencionan que el mayor contenido de proteína (69.31%) corresponde a las condiciones de pH de extracción y de precipitación de 10 y 4.5, respectivamente, mientras que el menor (40.53%) se obtuvo a los pH 8 y 3 (**Cruz et al., 2013**). Este resultado es ligeramente inferior al obtenido, donde con un pH de extracción de 10.5 y un pH de precipitación de 4 se ha conseguido un aislado proteico de 75.58%. Por otro lado, este porcentaje es inferior al reportado por **Timilsena et al., (2015)**, quienes obtuvieron un aislado con 92,5% de proteínas con un pH de extracción y pH de precipitación de 12 y 3, respectivamente. Un factor que sin duda afectó la solubilidad proteica de *S. hispanica* L. ha sido la presencia de mucílago, con el cual se requiere de una proporción de agua mayor a la de la harina desengrasada para poder extraer las proteínas de forma más eficiente. La obtención de los aislados proteicos se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.13 de Métodos.



**Figura 20.** Curva de solubilidad proteica de la harina desengrasada de *S. hispanica* L.

Los balances de materia y de proteína obtenidos durante la solubilización alcalina de las proteínas de *Salvia hispanica* L. a pH 10.5 y su posterior precipitación isoelectrica a pH 4 se presentan en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Balance de materia y de proteína en la obtención del aislado proteico a partir de la harina de *S. hispanica* L.

	<b>Balance de materia</b>	<b>Balance de proteínas</b>
Sobrenadante 1	1056.0 ± 0.1	576.0 ± 0.1
Sobrenadante 2	48.3 ± 0.0	15.09 ± 0.1
Sobrenadante 3	174.6 ± 0.1	26.675 ± 0.1
Aislado proteico	2175.6 ± 0.1	1644.0 ± 0.1
Extracción proteica	51.76%	

Los datos están expresados en mg respecto al contenido total de materia y de proteína de la harina

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El rendimiento de solubilidad observado ronda el 19%, mientras que el rendimiento de precipitación se aproxima al 76%. De acuerdo con estos datos, el porcentaje de recuperación de la proteína de partida es en torno al 52%. Estos valores son ligeramente inferiores a lo reportado por otros autores que han empleado el mismo procedimiento de extracción en otras especies vegetales (**Gonçalves *et al.*, 1997; Villanueva *et al.*, 1999**). Estas diferencias pueden deberse a la presencia del mucílago al momento de interaccionar con el agua, el cual no permite que la harina desengrasada pueda solubilizarse adecuadamente.

Una de las características que distingue un aislado proteico respecto de la harina desengrasada de partida es el incremento en su contenido proteico (Tabla 23).

**Tabla 23.** Caracterización fisicoquímica del aislado proteico de *S. hispanica* L.

<b>Análisis</b>	<b>Aislado proteico</b>
<b>Humedad (%)</b>	3.90 ± 0.08
<b>Grasa (%)</b>	4.1 ± 0.01
<b>Fibra (%)</b>	11.54 ± 0.01
<b>Cenizas (%)</b>	2.91 ± 0.03
<b>Proteínas (%)</b>	75.58 ± 0.02
<b>Azúcares solubles (%)</b>	1.92 ± 0.03
<b>Polifenoles (%)</b>	0.0123 ± 0.01
<b>*Otros</b>	0.0377 ± 0.00

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

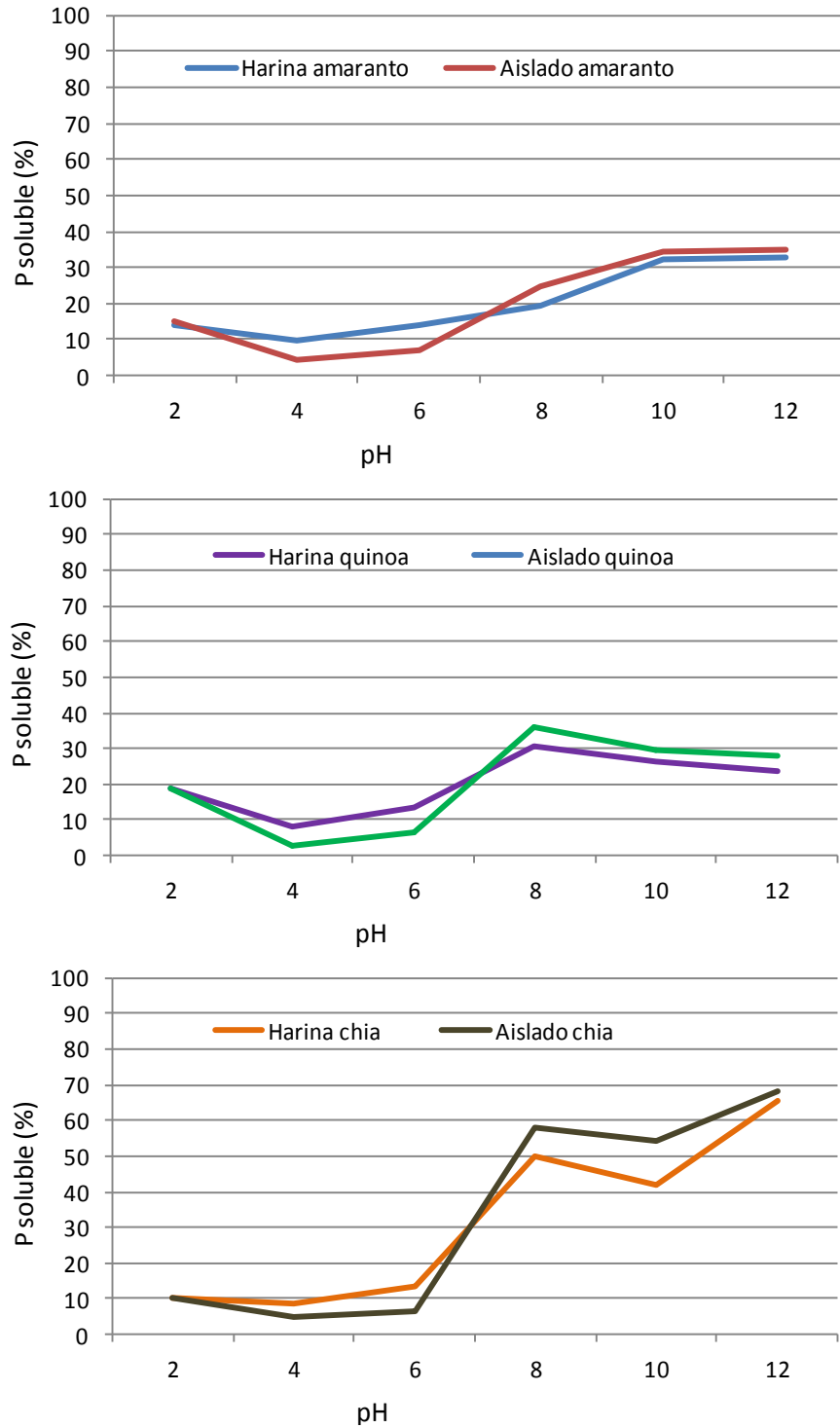
\*Otros: principalmente almidón y pectinas

El aislado presenta una riqueza proteica en torno al 75% en materia seca, lo cual representa un incremento de casi el doble del contenido de proteína de la harina desengrasada. Puede observarse como la mayoría de los componentes no proteicos han disminuido de forma considerable. Sin embargo, la gran excepción es la fibra, la cual, como se ha mencionado anteriormente, puede llegar a afectar la digestibilidad de las proteínas.

### 7.2.1. Propiedades funcionales de los aislados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

En la Figura 21 se muestran las curvas de solubilidad tanto de la harina desengrasada como del aislado proteico de las tres especies obtenidas a diferente pH. En ella puede observarse que en los puntos cercanos al punto isoeléctrico los valores de solubilidad disminuyen, mientras que conforme se vuelve el pH más básico la solubilidad aumenta. El comportamiento de ambas es muy similar, siendo la solubilidad del aislado proteico ligeramente inferior a la de la harina desengrasada. Estos resultados son inferiores a los reportados por **Marcone y Kakuda (1999)** en amaranto, **Aluko y Monu (2003)** en quínoa, y **Vázquez-Ovando et al. (2013)** en chíá, los cuales deben ser considerados, dado que las propiedades funcionales dependen en gran medida del grado de solubilidad que presenten los productos proteicos analizados, y por otra parte, la baja solubilidad de las muestras a pH ácido puede limitar en cierta medida la utilización de estos productos en la elaboración de alimentos, como es el caso de bebidas o jugos, los cuales requieren de pH ácidos para su formulación.

Con respecto a las demás propiedades funcionales, en la Tabla 24 se puede observar como los aislados proteicos presentaron un mejor comportamiento en la mayoría de las propiedades con respecto a la harina desengrasada en las tres especies analizadas. Los valores de absorción de agua son superiores a los descritos en la harina desengrasada, sin embargo, los valores de absorción de aceite son inferiores, evidenciando el hecho de que la interacción de la proteína con la fracción oleica puede afectar su comportamiento.



**Figura 21.** Solubilidad proteica de la harina desengrasada y el aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. frente al pH

**Tabla 24.** Propiedades tecnofuncionales del aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L.,*Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

	Amaranto	Quínoa	Chía
Absorción de agua (%)	333.33 ± 17.78	613.33 ± 22.22	500.00 ± 26.67
Absorción de aceite (%)	162.83 ± 6.94	120.72 ± 3.96	114.41 ± 4.18
Actividad emulsificante (%)	90.00 ± 3.33	90.00 ± 0.00	87.50 ± 1.67
Estabilidad emulsificante (%)	85.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00	90.00 ± 0.00
Capacidad de hinchamiento (mL/g)	3.67 ± 0.44	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00
Capacidad gelificante (+/-)	-	-	-
Capacidad espumante (%)	21.75 ± 0.89	56.50 ± 0.44	21.75 ± 0.89
	<b>Tiempo</b>		
Estabilidad espumante (%)	<b>15'</b>	20.00 ± 0.44	76.92 ± 0.44
	<b>30'</b>	0.00 ± 0.00	76.92 ± 0.44
	<b>60'</b>	0.00 ± 0.00	69.23 ± 0.67
	<b>120'</b>	0.00 ± 0.00	69.23 ± 0.67

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

Por otra parte, a diferencia de lo observado en la harina desengrasada, los aislados proteicos presentaron actividad emulsificante y espumante. Estos valores son ligeramente superiores a los reportados en amaranto por **Marcone y Kakuda (1999)**, quienes obtuvieron un 24% y 15.6% de capacidad y estabilidad espumante respectivamente, mientras que consiguieron un 79.3% y 93.7% de capacidad y estabilidad emulsificante. En cambio, en quínoa los valores de capacidad espumante y emulsificante son sumamente superiores a los observados por **Aluko y Monu (2003)**, quienes reportaron valores próximos al 20% en ambas propiedades. En la chía, los resultados obtenidos para la capacidad emulsificante son superiores a los descritos por **Vázquez-Ovando et al. (2013)**, quienes reportaron un 55%, mientras que la capacidad espumante presenta valores ligeramente inferiores, donde ellos alcanzaron un 28.68%.

Puesto que los aislados tienen una elevada concentración proteica, entre 80-90%, los resultados evidencian el comportamiento proteico de cada especie en particular.

7.2.2. Composición aminoacídica de los aislados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

El estudio de la composición aminoacídica del aislado proteico de *A. hypochondriacus* L. (Tabla 25) muestra un déficit en lisina en comparación con la composición equilibrada que presenta la harina en la mayoría de los aminoácidos esenciales.

**Tabla 25.** Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	Aislado proteico (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	8.166 ± 0.023	8.749 ± 0.118	9.077 ± 0.164	
Glu + Gln	17.189 ± 0.093	17.279 ± 0.028	19.015 ± 0.164	
Serina	7.563 ± 0.207	7.527 ± 0.172	6.167 ± 0.023	
Histidina	3.072 ± 0.018	3.318 ± 0.003	3.551 ± 0.052	1.9
Glicina	9.355 ± 0.109	8.456 ± 0.095	6.049 ± 0.181	
Treonina	4.564 ± 0.065	4.273 ± 0.059	4.190 ± 0.089	3.4
Arginina	9.636 ± 0.086	9.146 ± 0.097	10.686 ± 0.151	
Alanina	4.251 ± 0.044	4.047 ± 0.094	3.803 ± 0.051	
Prolina	0.312 ± 0.018	2.013 ± 0.001	3.839 ± 0.001	
Tirosina	6.837 ± 0.185	6.498 ± 0.169	5.294 ± 0.101	
Valina	4.073 ± 0.040	3.866 ± 0.078	3.931 ± 0.040	3.5
Metionina	0.882 ± 0.001	1.204 ± 0.001	0.515 ± 0.075	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	2.286 ± 0.044	2.286 ± 0.059	2.077 ± 0.028	
Isoleucina	3.756 ± 0.034	3.512 ± 0.053	3.894 ± 0.039	2.8
Leucina	6.867 ± 0.079	6.302 ± 0.107	6.849 ± 0.070	6.6
Fenilalanina	4.978 ± 0.066	4.578 ± 0.069	5.735 ± 0.055	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	6.764 ± 0.048	6.274 ± 0.110	4.639 ± 0.084	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

El déficit observado en el contenido de lisina puede deberse a múltiples factores. Uno de los más importantes es debido al proceso de extracción de las proteínas, en el cual durante la precipitación de las mismas y tras varios lavados puede perderse una fracción importante de albúminas ricas en lisina. Tal como describe **Ivanova et al. (2013)**, la disminución de lisina en los aislados proteicos puede también estar relacionada a la interacción de este aminoácido con otros componentes de la planta durante el procesamiento de la harina desengrasada, dando como resultado que los radicales de lisina formen compuestos complejos igual a los que forman las proteínas insolubles en medio alcalino, el cual se utilizó para la obtención del aislado. Otro factor es la formación de productos secundarios de la oxidación de polifenoles de la harina los cuales pueden reaccionar con las proteínas durante el proceso de extracción disminuyendo la biodisponibilidad de algunos aminoácidos, principalmente lisina (**Gassmann, 1983**).

Por ello, la disminución o eliminación de los componentes minoritarios durante el procesamiento de la harina resulta de gran importancia no solo para evitar algún efecto antinutricional sino también cualquier posible interacción con las proteínas, manteniendo por más tiempo el valor nutricional de los aislados proteicos.



El perfil aminoacídico del aislado proteico de *C. quinoa* Willd. (Tabla 26) muestra una composición sumamente equilibrada en la mayoría de los aminoácidos esenciales, incluido la lisina, lo cual eleva el valor nutricional del producto obtenido.

**Tabla 26.** Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de *C. quinoa* Willd.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	Aislado proteico (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	7.782 ± 0.097	8.298 ± 0.219	10.783 ± 0.203	
Glu + Gln	15.585 ± 0.000	16.108 ± 0.072	17.175 ± 0.108	
Serina	5.435 ± 0.121	5.519 ± 0.049	5.970 ± 0.041	
Histidina	3.354 ± 0.113	3.378 ± 0.046	3.789 ± 0.141	1.9
Glicina	6.254 ± 0.288	6.665 ± 0.031	5.146 ± 0.016	
Treonina	4.706 ± 0.178	4.487 ± 0.049	4.414 ± 0.037	3.4
Arginina	10.323 ± 0.231	10.173 ± 0.060	8.833 ± 0.020	
Alanina	4.389 ± 0.038	4.994 ± 0.050	4.919 ± 0.026	
Prolina	4.452 ± 0.019	1.349 ± 0.000	1.267 ± 0.070	
Tirosina	7.629 ± 0.176	6.381 ± 0.104	7.130 ± 0.194	
Valina	6.102 ± 0.254	5.232 ± 0.000	4.783 ± 0.113	3.5
Metionina	1.362 ± 0.031	1.412 ± 0.087	0.395 ± 0.016	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	1.269 ± 0.032	1.520 ± 0.040	2.304 ± 0.052	
Isoleucina	4.118 ± 0.084	4.195 ± 0.051	3.696 ± 0.075	2.8
Leucina	7.761 ± 0.091	7.841 ± 0.090	8.416 ± 0.173	6.6
Fenilalanina	5.143 ± 0.090	5.102 ± 0.125	5.224 ± 0.007	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	6.445 ± 0.096	6.588 ± 0.071	5.960 ± 0.056	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

En concordancia a lo descrito por **Abugoch et al. (2008)**, quienes compararon el contenido de aminoácidos esenciales de dos extractos proteicos de *C. quinoa* Willd. obtenidos a diferente pH de extracción, los valores son bastante similares, incluyendo la lisina, lo cual resalta la importancia nutricional del producto obtenido.

La composición de aminoácidos del aislado proteico de *S. hispanica* L. (Tabla 27), en comparación al contenido de aminoácidos esenciales presentes en la harina, muestra un déficit en algunos de ellos, dentro de los cuales se encuentra la lisina.

**Tabla 27.** Composición aminoacídica de la harina y del aislado proteico de *S. hispanica* L.

Aminoácidos	Harina (mg/100 g)	Harina desengrasada (mg/100 g)	Aislado proteico (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	7.238 ± 0.076	8.555 ± 0.118	9.391 ± 0.196	
Glu + Gln	17.467 ± 0.133	18.038 ± 0.048	19.367 ± 0.130	
Serina	6.237 ± 0.032	6.639 ± 0.029	6.505 ± 0.135	
Histidina	3.085 ± 0.091	3.314 ± 0.092	4.076 ± 0.102	1.9
Glicina	4.881 ± 0.091	5.789 ± 0.085	4.950 ± 0.103	
Treonina	3.848 ± 0.065	4.366 ± 0.045	3.726 ± 0.114	3.4
Arginina	9.808 ± 0.003	10.465 ± 0.006	9.775 ± 0.169	
Alanina	4.783 ± 0.010	5.582 ± 0.034	4.962 ± 0.040	
Prolina	0.625 ± 0.004	2.237 ± 0.000	2.698 ± 0.000	
Tirosina	6.043 ± 0.094	5.531 ± 0.094	8.735 ± 0.000	
Valina	4.540 ± 0.092	4.403 ± 0.078	4.015 ± 0.158	3.5
Metionina	0.904 ± 0.039	1.516 ± 0.000	0.761 ± 0.021	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	2.712 ± 0.003	2.376 ± 0.034	2.467 ± 0.068	
Isoleucina	4.099 ± 0.073	3.359 ± 0.052	2.424 ± 0.084	2.8
Leucina	7.868 ± 0.070	7.261 ± 0.135	6.639 ± 0.015	6.6
Fenilalanina	6.166 ± 0.022	5.505 ± 0.097	5.222 ± 0.003	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	5.519 ± 0.060	5.166 ± 0.094	4.716 ± 0.000	5.8

a: Metionina + Cisteina

b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

Estos valores son similares a los reportados por **Vázquez-Ovando et al. (2010)**, inclusive en el contenido de lisina. Pese a la mejora en el contenido proteico del aislado, alguno de los factores antes descritos puede estar relacionado con la pérdida de aminoácidos, lisina en particular, lo cual disminuye la calidad general de sus proteínas.

### **7.3. Obtención de hidrolizados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. mediante la hidrólisis con Alcalasa y Flavorzima**

La solubilidad de las proteínas suele verse afectada por las altas temperaturas y concentraciones de solventes orgánicos empleados durante el proceso de extracción del aceite de la harina, ocasionando una disminución en los rendimientos de extracción proteica durante la obtención de los aislados proteicos. Es de esperarse que resulte un parámetro determinante para otras propiedades funcionales, por tanto se pretende obtener un producto parcialmente hidrolizado con mejores propiedades funcionales que la harina de partida que no limite su empleo para la obtención de péptidos bioactivos, que puedan ser empleados para el tratamiento de enfermedades crónicas, o bien, para utilizarse en la elaboración de suplementos alimentarios.

Para la obtención de los hidrolizados proteicos, se han seleccionado dos enzimas de grado alimentario, la Alcalasa® 2.4L y la Flavorzima® 1000MG, una endo- y exo-proteasa, respectivamente. De ambas enzimas se conocen bien las condiciones óptimas de temperatura y pH, lo cual las convierte en interesantes productos comerciales, además de económicos, que ayuden a mejorar la solubilidad de estas proteínas.

La hidrólisis enzimática se realizó de acuerdo al procedimiento previamente descrito en la metodología (ver apartado 6.3.15 de Métodos).

Las condiciones del ensayo de hidrólisis proteica, empleando tanto Alcalasa® 2.4L como Flavorzima® 1000MG, fueron las siguientes:

#### Hidrólisis extensiva con Alcalasa® 2.4L

- Concentración del sustrato: 5%
- Relación enzima/sustrato: 0.3 AU/g proteína
- Temperatura: 50°C
- pH: 8
- Tiempo de hidrólisis: 60 minutos (tomando alícuotas cada 15 minutos)
- Inactivación enzimática: 85°C/15 minutos

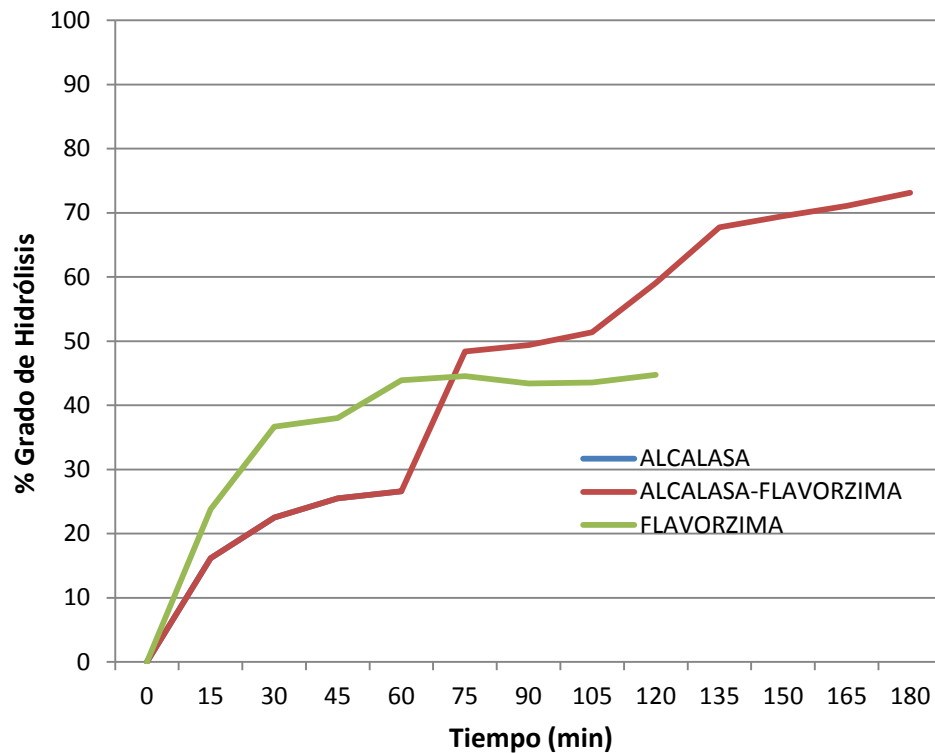
#### Hidrólisis extensiva con Flavorzima® 1000MG

- Concentración del sustrato: 5%
- Relación enzima/sustrato: 50 ULAP/g proteína
- Temperatura: 50°C
- pH: 7
- Tiempo de hidrólisis: 120 minutos (tomando alícuotas cada 15 minutos)
- Inactivación enzimática: 85°C/15 minutos

#### Hidrólisis secuencial (Alcalasa® 2.4L y Flavorzima® 1000MG)

- Hidrólisis extensiva con Alcalasa® 2.4L seguida de una hidrólisis extensiva con Flavorzima® 1000MG (empleando las mismas condiciones)
- Tiempo de hidrólisis: 180 minutos (tomando alícuotas cada 15 minutos)

El grado de hidrólisis obtenido de forma extensiva y secuencial en *A. hypochondriacus* L. puede observarse en la Figura 22.



**Figura 22.** Grado de hidrólisis a través del tiempo de *A. hypochondriacus* L. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima

Como era de esperarse, el mayor grado de hidrólisis se alcanzó a los 60 minutos (26.59%), a los 120 minutos (44.73%) y a los 180 minutos (73.15%) empleando Alcalasa, Flavorzima y ambas, respectivamente. Favorablemente, se ha conseguido un grado de hidrólisis superior al 10% en los tres ensayos, con lo que se prevee que en el hidrolizado obtenido se encuentren presentes péptidos bioactivos que puedan ser evaluados para conocer su uso potencial, ya sea en el tratamiento de enfermedades crónicas, o para la incorporación como suplemento alimentario, con el cual se consiga mejorar las propiedades funcionales del mismo.

Por otra parte, el hidrolizado obtenido empleando Alcalasa durante 60 minutos de hidrólisis ha sido, en comparación con los demás, el que ha presentado la mayor riqueza proteica, con un valor cercano al 80%, y mejor rendimiento, con 41.28 mg prot/mL. Por este motivo, se seleccionó para determinar su caracterización fisicoquímica (Tabla 28) y evaluar sus propiedades funcionales.

**Tabla 28.** Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de *A. hypochondriacus* L.

<b>Análisis</b>	<b>Harina desengrasada</b>	<b>Aislado proteico</b>	<b>Hidrolizado proteico</b>
<b>Humedad (%)</b>	9.19 ± 0.085	2.34 ± 0.040	1.94 ± 0.035
<b>Grasa (%)</b>	0.25 ± 0.025	0.01 ± 0.001	9.2 ± 0.000
<b>Fibra (%)</b>	11.95 ± 0.022	3.97 ± 0.067	4.36 ± 0.551
<b>Cenizas (%)</b>	8.64 ± 0.448	2.09 ± 0.177	2.12 ± 0.067
<b>Proteínas (%)</b>	15.02 ± 0.186	89.25 ± 0.918	81.38 ± 0.563
<b>Azúcares solubles (%)</b>	1.66 ± 0.001	0.52 ± 0.001	0.27 ± 0.001
<b>Polifenoles (%)</b>	0.009 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.0427 ± 0.001
<b>*Otros</b>	53.281 ± 0.000	1.809 ± 0.000	0.6873 ± 0.000

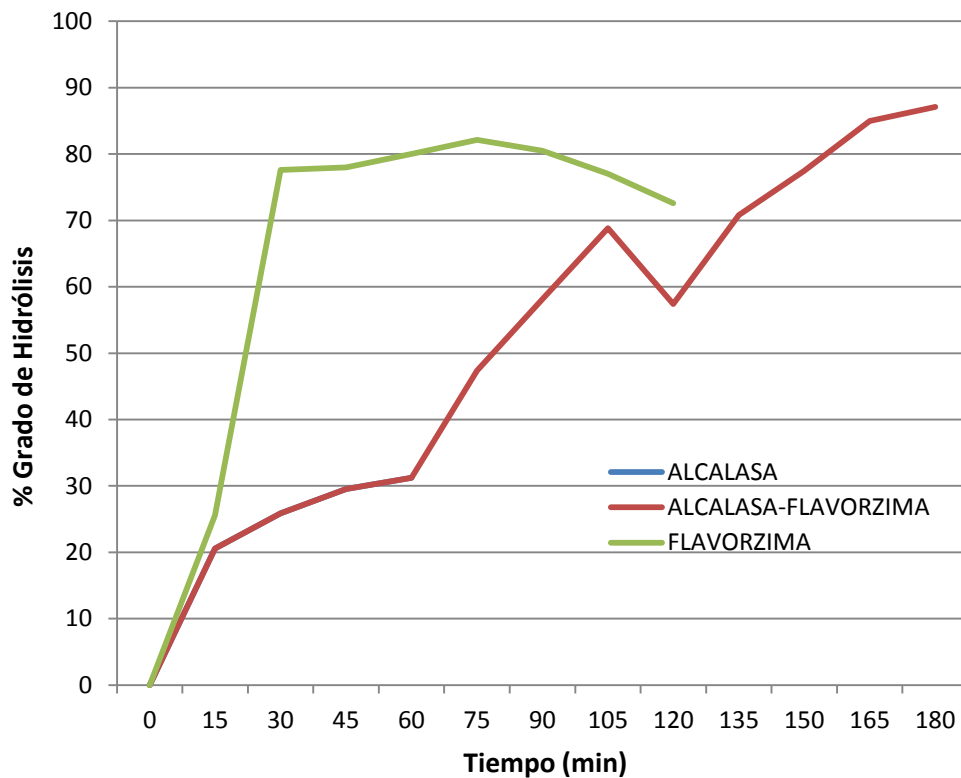
Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

\*Otros: principalmente almidón y pectinas

Como se puede observar, la riqueza proteica del hidrolizado obtenido (81.38%) es bastante superior al de la harina desengrasada (15.02%), pero ha disminuido su contenido respecto al aislado proteico (89.25%). El hidrolizado presenta valores más altos de proteína, respecto a los demás componentes, lo cual se debe a la disolución de las mismas durante la hidrólisis, seguida de la centrifugación para separar la materia

insoluble y no digerida. Sin embargo, acorde a lo descrito por **Jamdar et al. (2010)**, durante la hidrólisis ha aumentado el contenido de grasa, lo cual puede deberse a la formación de una emulsión junto con proteínas y péptidos, provocando la retención de grasa en los hidrolizados y afectando el rendimiento de la fracción proteica.

Por otra parte, el grado de hidrólisis obtenido de forma extensiva y secuencial en *C. quinoa* Willd. puede observarse en la Figura 23.



**Figura 23.** Grado de hidrólisis a través del tiempo de *C. quinoa* Willd. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima

El grado mayor de hidrólisis se observó a los 60 minutos (31.22%), a los 75 minutos (82.11%) y a los 180 minutos (87.08%) empleando Alcalasa, Flavorzima y ambas, respectivamente. Por otra parte, el hidrolizado obtenido empleando Alcalasa durante 60 minutos de hidrólisis, en comparación con los demás, presenta la mayor riqueza proteica, con un valor cercano al 75.44%, y el mejor rendimiento, con 34.93 mg prot/mL. Por ello, ha sido elegido para determinar su caracterización fisicoquímica (Tabla 29) y evaluar sus propiedades funcionales.

**Tabla 29.** Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de *C. quinoa* Willd.

<b>Análisis</b>	<b>Harina desengrasada</b>	<b>Aislado proteico</b>	<b>Hidrolizado proteico</b>
<b>Humedad (%)</b>	9.82 ± 0.020	4.06 ± 0.044	4.77 ± 0.028
<b>Grasa (%)</b>	3.00 ± 0.141	1.087 ± 0.004	9.5 ± 0.000
<b>Fibra (%)</b>	7.13 ± 0.188	10.68 ± 0.193	3.89 ± 0.059
<b>Cenizas (%)</b>	5.11 ± 0.103	5.79 ± 0.088	7.69 ± 0.269
<b>Proteínas (%)</b>	18.64 ± 0.172	71.50 ± 0.792	72.13 ± 0.442
<b>Azúcares solubles (%)</b>	1.28 ± 0.000	3.18 ± 0.000	0.83 ± 0.001
<b>Polifenoles (%)</b>	0.024 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.16 ± 0.001
<b>*Otros</b>	54.996 ± 0.000	3.693 ± 0.000	1.8517 ± 0.000

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

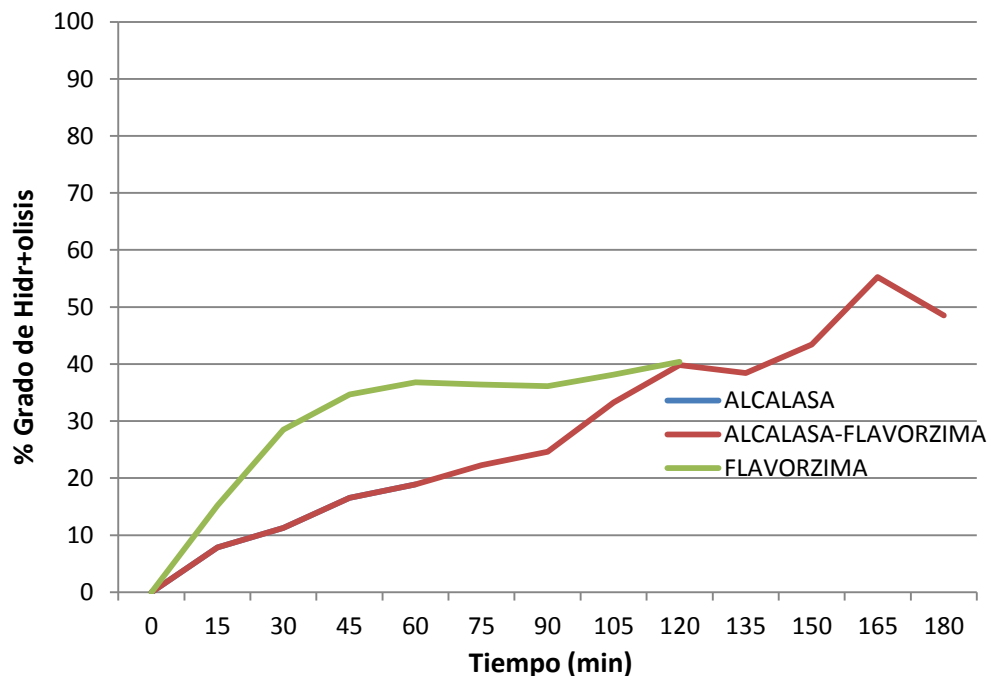
\*Otros: principalmente almidón y pectinas

A diferencia de lo observado en amaranto, la riqueza proteica del hidrolizado obtenido (72.13%) es superior tanto a la riqueza proteica de la harina desengrasada (18.64%) como a la del aislado proteico (71.50%). A pesar de esto, el contenido proteico



del hidrolizado es inferior al de un aislado proteico convencional, el cual presenta valores cercanos al 90%. Esto puede estar relacionado, tal como se mencionó anteriormente, a la grasa retenida debido a la formación de una emulsión junto con las proteínas, pero también puede atribuirse a las sales añadidas durante la solubilización de las proteínas, así como de la sosa adicionada para el ajuste del pH durante la hidrólisis enzimática, las cuales ocasionan un incremento en la concentración de cenizas. Esto en concordancia a lo descrito por Šližyte *et al.* (2005), quienes mencionan que una parte de las cenizas, como componente mineral, es soluble en agua y por tanto influye en el rendimiento de la fracción proteica hidrolizada.

En lo que respecta a la chíá, su grado de hidrólisis obtenido de forma extensiva y secuencial puede observarse en la Figura 24.



**Figura 24.** Grado de hidrólisis a través del tiempo de *S. hispanica* L. obtenidos mediante el empleo de Alcalasa y Flavorzima

En *S. hispanica* L. el mayor grado de hidrólisis se observó a los 60 minutos (18.89%), a los 120 minutos (40.36%) y a los 165 minutos (55.23%) empleando Alcalasa, Flavorzima y ambas, respectivamente.

En el hidrolizado obtenido empleando Alcalasa durante 60 minutos de hidrólisis se observó la mayor riqueza proteica, con un valor cercano al 78.50%, y el mejor rendimiento, con 36.82 mg prot/mL, en comparación con los demás hidrolizados. Por esta razón, se seleccionó para caracterizarlo fisicoquímicamente (Tabla 30), y además se evaluarán sus propiedades funcionales.

**Tabla 30.** Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de *S. hispanica* L.

<b>Análisis</b>	<b>Harina desengrasada</b>	<b>Aislado proteico</b>	<b>Hidrolizado proteico</b>
<b>Humedad (%)</b>	1.32 ± 0.03	3.90 ± 0.08	3.95 ± 0.010
<b>Grasa (%)</b>	5.1 ± 0.15	4.1 ± 0.01	6.3 ± 0.000
<b>Fibra (%)</b>	49.39 ± 0.46	11.54 ± 0.01	10.68 ± 0.399
<b>Cenizas (%)</b>	7.22 ± 0.08	2.91 ± 0.03	3.64 ± 0.057
<b>Proteínas (%)</b>	31.76 ± 0.09	75.58 ± 0.02	73.31 ± 0.088
<b>Azúcares solubles (%)</b>	5.12 ± 0.05	1.92 ± 0.03	1.11 ± 0.001
<b>Polifenoles (%)</b>	0.0399 ± 0.01	0.0123 ± 0.01	0.13 ± 0.001
<b>*Otros</b>	0.0501 ± 0.00	0.0377 ± 0.00	0.88 ± 0.000

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

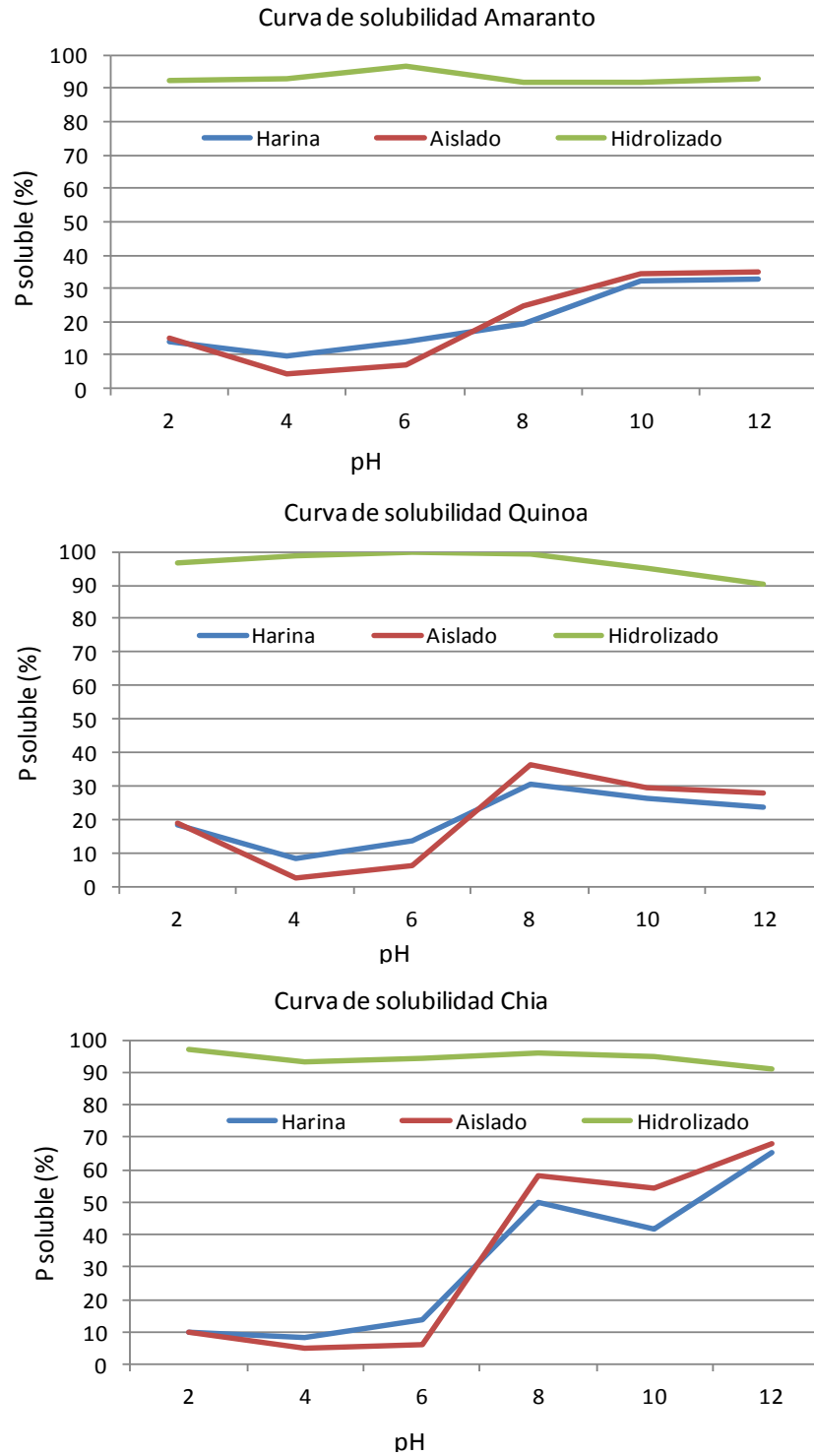
\*Otros: principalmente almidón y pectinas

Aunque la riqueza proteica del hidrolizado (73.31%) mejora el contenido proteico de la harina (31.76%) es ligeramente inferior a la del aislado proteico (75.58%).

Como se ha mencionado en otros apartados, la digestibilidad de las proteínas de *S. hispanica* L. suele verse afectada por el alto contenido en fibra que presenta, dentro del cual un porcentaje importante es soluble, lo cual complica su separación de la fracción proteica al momento de centrifugar los hidrolizados. Además, otro factor que se debe considerar es el alto contenido de grasa que esta misma presenta, ocasionando la formación de emulsiones que afectarán el contenido proteico del hidrolizado.

### 7.3.1. Propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

Por otra parte, el grado de hidrólisis tiende a influir en las propiedades funcionales del hidrolizado obtenido. De ahí que resulte importante resaltar la alta solubilidad presente en el hidrolizado obtenido con Alcalasa en el rango de pH entre 2-12 (Figura 25) en comparación con la harina y el aislado proteico. Estos resultados son similares a los descritos por **Aluko y Monu (2003)** en quínoa, quienes observaron que la hidrólisis enzimática mejora la solubilidad del producto alcanzando valores de hasta 80%. Sin embargo, este aumento de solubilidad no siempre va acompañado de una mejora global de las propiedades funcionales debido probablemente al pequeño tamaño de los péptidos que no permiten estabilizar las interfaces aire/agua en el caso de la propiedad espumante o aceite/agua en el de la emulsificante.



**Figura 25.** Solubilidad proteica de la harina desengrasada, el aislado e hidrolizado proteico obtenido a los 60 minutos con Alcalasa de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. frente al pH

Por ejemplo, en la Tabla 31, se muestran los resultados de las propiedades funcionales de las tres especies, donde la capacidad de absorción de agua es una prueba que no aplica para este tipo de productos debido a la alta solubilidad, mientras que la capacidad de absorción de aceite muestra un mejor comportamiento que la harina y el aislado en las tres especies.

**Tabla 31.** Propiedades tecnofuncionales del hidrolizado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

	Amaranto	Quínoa	Chía	
Absorción de agua (%)	No Aplica	No Aplica	No Aplica	
Absorción de aceite (%)	207.01 ± 3.32	210.03 ± 9.12	330.27 ± 16.60	
Actividad emulsificante (%)	86.67 ± 1.11	89.17 ± 4.44	75.00 ± 0.00	
Estabilidad emulsificante (%)	40.00 ± 0.00	90.00 ± 0.00	50.00 ± 0.00	
Capacidad de hinchamiento (mL/g)	No Aplica	No Aplica	No Aplica	
Capacidad gelificante (+/-)	No Aplica	No Aplica	No Aplica	
Capacidad espumante (%)	43.46 ± 1.11	43.46 ± 1.11	43.46 ± 1.33	
	<b>Tiempo</b>			
Estabilidad espumante (%)	<b>15'</b>	70.00 ± 1.11	60.00 ± 1.33	70.00 ± 1.11
	<b>30'</b>	60.00 ± 0.67	40.00 ± 1.11	60.00 ± 0.67
	<b>60'</b>	60.00 ± 0.67	20.00 ± 0.89	60.00 ± 0.67
	<b>120'</b>	40.00 ± 0.44	10.00 ± 0.44	40.00 ± 0.44

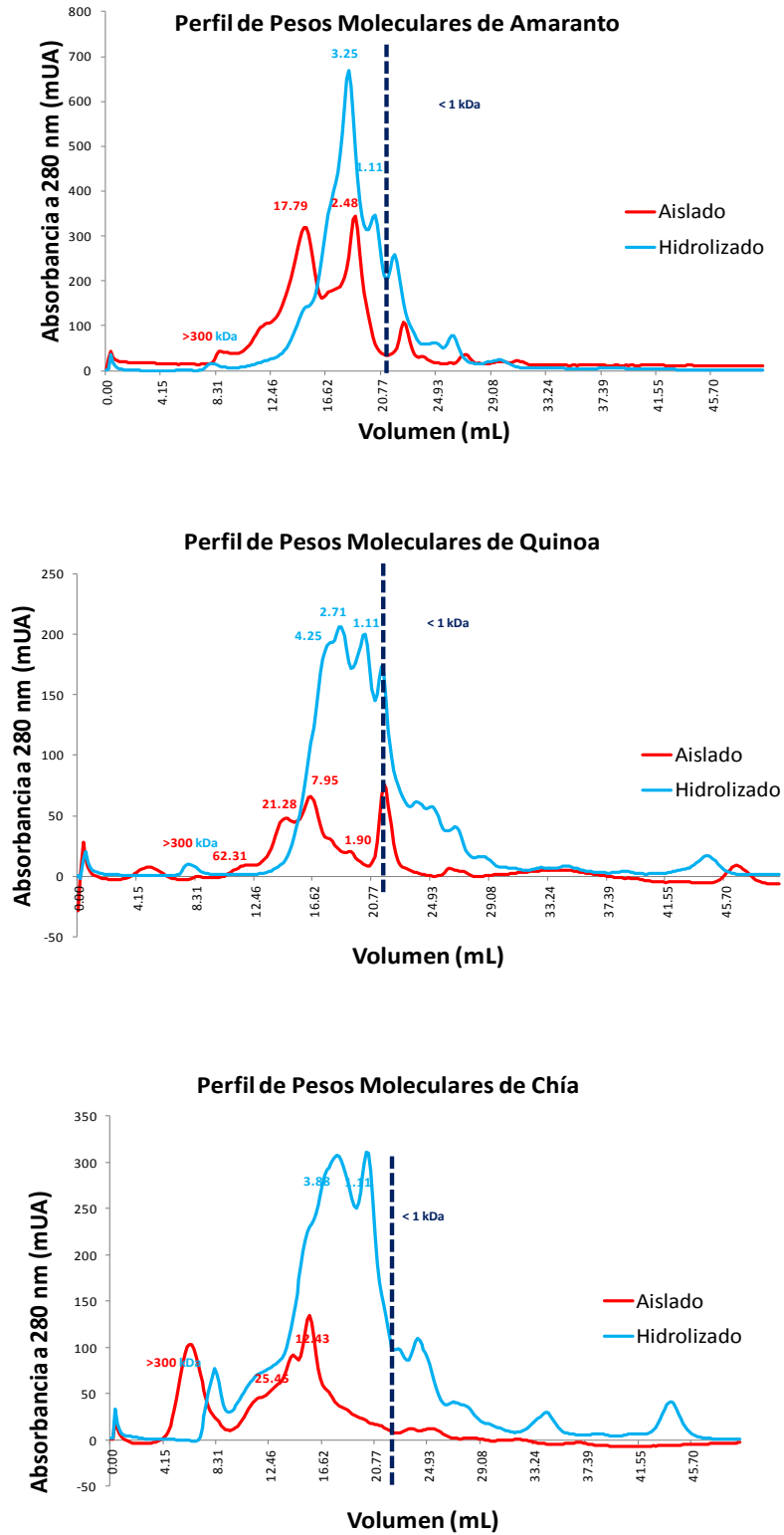
Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

En lo que respecta a la actividad emulsificante, las tres especies mostraron valores similares e incluso inferiores que el aislado proteico, y su estabilidad no fue óptima salvo en quínoa, la cual alcanzó hasta un 90%. Esto resulta acorde a lo observado por **Aluko y Monu (2003)** quienes reportaron que los hidrolizados proteicos de quínoa presentan una alta estabilidad, pero su actividad es baja, por lo que su empleo para la

elaboración de emulsiones alimenticias no es tan bueno como el caso de los concentrados proteicos.

Un comportamiento similar ocurre con la capacidad espumante, en donde tanto en amaranto como en chíá se observa mejor actividad y estabilidad, mientras que en la quínoa se muestra una actividad ligeramente inferior y una estabilidad muy por debajo de lo alcanzado en el concentrado proteico. Por último, cabe resaltar la elevada absorción de aceite observada en los hidrolizados proteicos causada probablemente por una mayor exposición de los grupos hidrófobicos a causa de la destrucción de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas.

En la Figura 26, se observa el cambio en el perfil de proteínas del aislado proteico por efecto de la hidrólisis enzimática empleando Alcalasa, con la cual se generaron pequeños peptidos que fueron identificados en el cromatograma. Considerando que los hidrolizados proteicos obtenidos presentan una mejor solubilidad que la harina desengrasada y el aislado proteico, otros factores a parte de la solubilidad deben estar afectando a las propiedades funcionales.



**Figura 26.** Perfil de pesos moleculares del aislado e hidrolizado proteico de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA para cada una de las propiedades tecnofuncionales de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de amaranto (Tabla 32):

**Tabla 32. Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Amaranto**

Propiedad tecnofuncional	Materia prima	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Capacidad de absorción de agua</b>	Harina	0.4882 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.6153 ± 0.02439	b	
	Hidrolizado proteico	1.5708 ± 0.00000	c	
<b>Capacidad de absorción de aceite</b>	Harina	0.4154 ± 0.00098	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.4153 ± 0.01213	a	
	Hidrolizado proteico	0.4723 ± 0.00569	b	
<b>Capacidad de hinchamiento</b>	Harina	0.2255 ± 0.00000	c	p<0.01
	Aislado proteico	0.1923 ± 0.15750	b	
	Hidrolizado proteico	0.0000 ± 0.00000	a	
<b>Capacidad emulsificante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	1.2547 ± 0.07844	b	
	Hidrolizado proteico	1.1973 ± 0.02098	b	
<b>Capacidad espumante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.4856 ± 0.00070	b	
	Hidrolizado proteico	0.7205 ± 0.00116	c	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La capacidad de absorción de agua, la capacidad de absorción de aceite, la capacidad de hinchamiento, la capacidad emulsificante y la capacidad espumante de las distintas materias primas empleadas de Amaranto difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a su naturaleza proteica.



A continuación se presentan la estadística descriptiva y ANOVA para cada una de las propiedades tecnofuncionales de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de quínoa (Tabla 33):

**Tabla 33. Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Quínoa**

Propiedad tecnofuncional	Materia prima	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Capacidad de absorción de agua</b>	Harina	0.5120 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.8999 ± 0.03132	b	
	Hidrolizado proteico	1.5708 ± 0.00000	c	
<b>Capacidad de absorción de aceite</b>	Harina	0.4150 ± 0.01861	b	p<0.01
	Aislado proteico	0.3548 ± 0.00806	a	
	Hidrolizado proteico	0.4760 ± 0.01500	c	
<b>Capacidad de hinchamiento</b>	Harina	0.2055 ± 0.00716	c	p<0.01
	Aislado proteico	0.1475 ± 0.00975	b	
	Hidrolizado proteico	0.0000 ± 0.00000	a	
<b>Capacidad emulsificante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	1.2490 ± 0.00000	b	
	Hidrolizado proteico	1.2420 ± 0.08903	b	
<b>Capacidad espumante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.8509 ± 0.00058	c	
	Hidrolizado proteico	0.7201 ± 0.00058	b	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La capacidad de absorción de agua, la capacidad de absorción de aceite, la capacidad de hinchamiento, la capacidad emulsificante y la capacidad espumante de las distintas materias primas empleadas de quínoa difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a su naturaleza proteica.

A continuación se presentan la estadística descriptiva y ANOVA para cada una de las propiedades tecnofuncionales de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de chíá (Tabla 34):

**Tabla 34. Estadística descriptiva y ANOVA de las propiedades tecnofuncionales de las diferentes materias primas en Chíá**

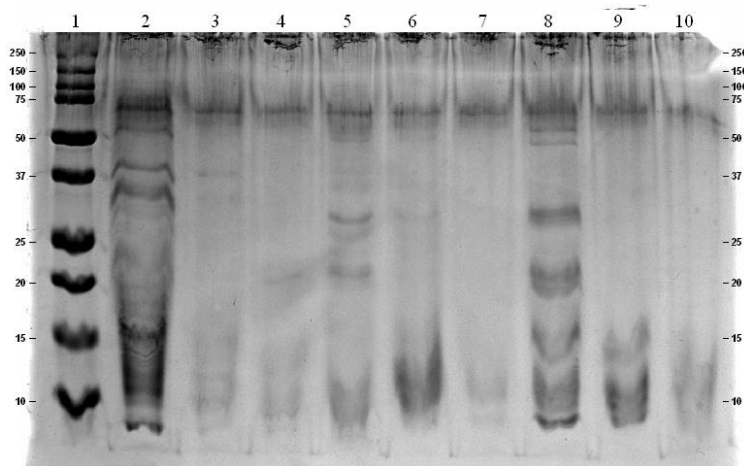
Propiedad tecnofuncional	Materia prima	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Capacidad de absorción de agua</b>	Harina	1.5708 ± 0.00000	b	p<0.01
	Aislado proteico	0.7854 ± 0.03467	a	
	Hidrolizado proteico	1.5708 ± 0.00000	b	
<b>Capacidad de absorción de aceite</b>	Harina	0.5264 ± 0.00774	b	p<0.01
	Aislado proteico	0.3450 ± 0.00905	a	
	Hidrolizado proteico	0.6121 ± 0.02313	b	
<b>Capacidad de hinchamiento</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	1.2105 ± 0.03799	c	
	Hidrolizado proteico	1.0472 ± 0.00000	b	
<b>Capacidad emulsificante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	1.2105 ± 0.03799	c	
	Hidrolizado proteico	1.0472 ± 0.00000	b	
<b>Capacidad espumante</b>	Harina	0.0000 ± 0.00000	a	p<0.01
	Aislado proteico	0.4856 ± 0.00070	b	
	Hidrolizado proteico	0.7201 ± 0.00058	c	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La capacidad de absorción de agua, la capacidad de absorción de aceite, la capacidad de hinchamiento, la capacidad emulsificante y la capacidad espumante de las distintas materias primas empleadas de Chíá difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a su naturaleza proteica.

#### 7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

El contenido proteico de la harina desengrasada de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. es 15.02%, 18.64% y 31.76%, respectivamente (Tabla 5, 9 y 13). Estas proteínas pueden agruparse en dos fracciones principales : globulinas y albúminas. Como puede observarse en el análisis por PAGE-SDS (Figura 27), las proteínas del extracto crudo estan caracterizadas por una serie de bandas comprendidas entre 39-31 kD y 27-22 kDa que corresponden a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las globulinas, respectivamente (Figura 27, carril 2 para amaranto, 5 para quínoa y 8 para chía). Por otro lado, tambien pueden observarse otras bandas de pesos moleculares comprendidas entre 13-16 kDa que pertenecen a las albúminas (Figura 27, carril 2, 5 y 8).



**Figura 27.** Gel de poliacrilamida con dodecilhidrogenosulfato sódico (SDS-PAGE) de las harinas, aislados e hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

En lo que respecta a los aislados proteicos de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L., su contenido proteico es de 89.25%, 71.50% y 75.58%, respectivamente (Tabla 19, 21 y 23). En los carriles 3 (amaranto), 6 (quínoa) y 9 (chía) se pueden observar bandas de pesos moleculares comprendidas entre 16-12 kDa que pertenecen a las albúminas (Figura 27, carril 3, 6 y 9).

El contenido proteico de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. es de 81.38%, 72.13% y 73.31%, respectivamente (Tabla 28, 29 y 30). Como consecuencia de la hidrólisis, en ellos comienzan a distinguirse fracciones entre 15-10 kDa, desapareciendo las bandas electroforéticas de mayor peso molecular. En el PAGE-SDS realizado, no se aprecia ninguna banda entre 5-3 kDa, observada anteriormente por FPLC (Figura 26), debido probablemente a la incapacidad del Coomassie de teñir péptidos de bajo peso molecular.

## **7.5. Ensayos de actividad biológica de los hidrolizados proteicos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. obtenidos mediante Alcalasa y Flavorzima**

Las propiedades de los hidrolizados dependen de una serie de factores, entre los que se incluyen el tipo de proteína, el grado de hidrólisis de la enzima empleada en ella, las condiciones ambientales, así como cualquier pretratamiento que haya ocurrido en el sustrato. Como se ha mencionado previamente, las enzimas Alcalasa® 2.4L y Flavorzima® 1000MG fueron utilizadas para la obtención de los hidrolizados proteicos constituidos por una amplia gama de péptidos con diferentes pesos moleculares. La importancia de este apartado es determinar si en alguno de ellos existe actividad biológica y evaluar su funcionalidad como antioxidante o antihipertensivo.

### **7.5.1. Actividad antioxidante.**

En la industria alimentaria, los antioxidantes representan uno de los aditivos utilizados más importantes por sus múltiples ventajas. Sin embargo, ha sido cuestionado el empleo de aquellos obtenidos por vía sintética debido a su toxicidad potencial, por lo que recientemente la búsqueda de antioxidantes provenientes de fuentes naturales ha tomado gran interés. Numerosos estudios han confirmado que una amplia gama de hidrolizados proteicos poseen actividad antioxidante, lo que supone que las proteínas modificadas enzimáticamente pueden servir como fuentes naturales de antioxidantes en los modelos alimentarios para conservar estos alimentos y extender su vida útil.

Existen varios métodos para evaluar las propiedades antioxidantes de los hidrolizados, dentro de los cuales, por mencionar algunos, se encuentra la actividad antiradical contra el DPPH y los radicales hidroxilo, el poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) y el barrido de la actividad superóxido, entre otros.

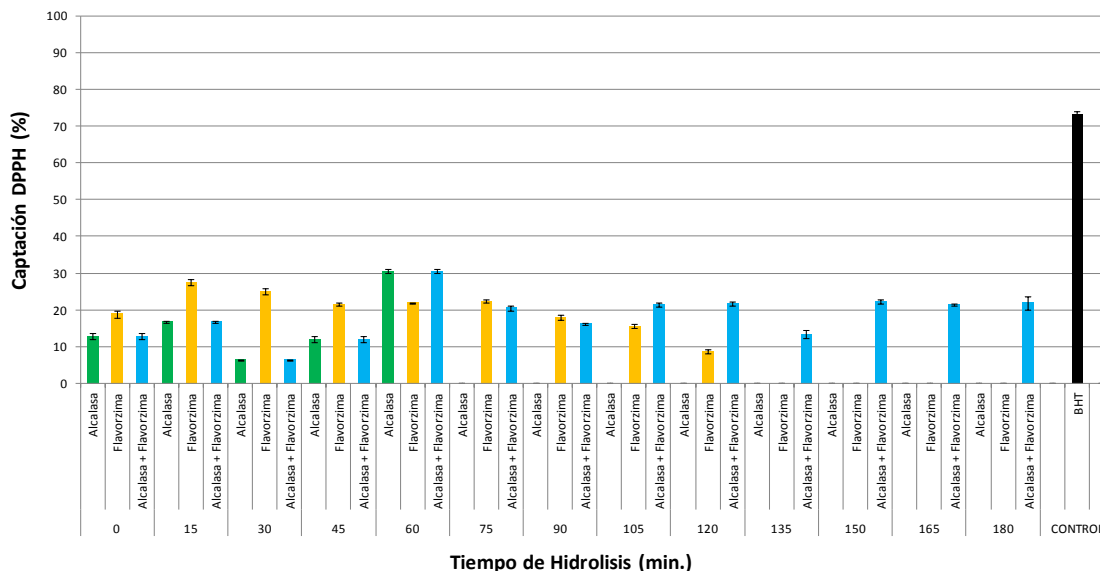
#### 7.5.1.1 DPPH

Entre los métodos que miden la capacidad de eliminación de radicales libres, el 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), es uno de los más ampliamente empleados. La capacidad de eliminar el radical libre estable DPPH, el cual presenta máxima absorbancia a 517 nm disuelto en etanol, puede expresarse como una medida de la actividad antioxidante. Durante el ensayo, el radical cromógeno púrpura se reduce mediante compuestos antioxidantes/reductores a la correspondiente hidracina amarilla pálida. La reducción del radical cromógeno púrpura por los antioxidantes donadores de hidrógeno se controla mediante la disminución de la densidad óptica a longitudes de onda largas (515-520 nm) (**Musa *et al.*, 2013**). En otras palabras, cuando el DPPH encuentra una sustancia donadora de protones, como un antioxidante, el radical puede ser secuestrado y, así, disminuye la absorbancia. Algunas ventajas de este ensayo es que es simple, puesto que no requiere de ninguna preparación especial, es sensible, independientemente de la polaridad de la muestra, y no requiere de equipos sofisticados.

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método descrito por **Wu *et al.*, (2003)**. Como control positivo se utilizó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 1 mg/mL. Se evaluaron los hidrolizados proteicos a una concentración de 1 mg Prot/mL obtenidos a distintos

tiempos empleando hidrólisis extensiva con Alcalasa y Flavorzima, así como su hidrólisis secuencial, de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

La capacidad antioxidante (porcentaje de captación del DPPH) de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L. se muestra en la Figura 28.



**Figura 28.** Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L.

Como puede observarse, los distintos hidrolizados extensivos y secuenciales obtenidos empleando Alcalasa y Flavorzima no muestran un notable efecto antioxidante en comparación al control positivo BHT (73.35%), siendo el hidrolizado Alcalasa 60 minutos el de mayor porcentaje de captación de DPPH (30.54%). Este resultado es inferior al obtenido por **Soriano-Santos y Escalona-Buendia (2015)**, quienes utilizando Alcalasa durante 2.3 horas y con una relación enzima/sustrato de 0.73 como condiciones de hidrólisis, han conseguido un 39.9% de captación de DPPH en la misma especie.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos con una hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos (Tabla 35):

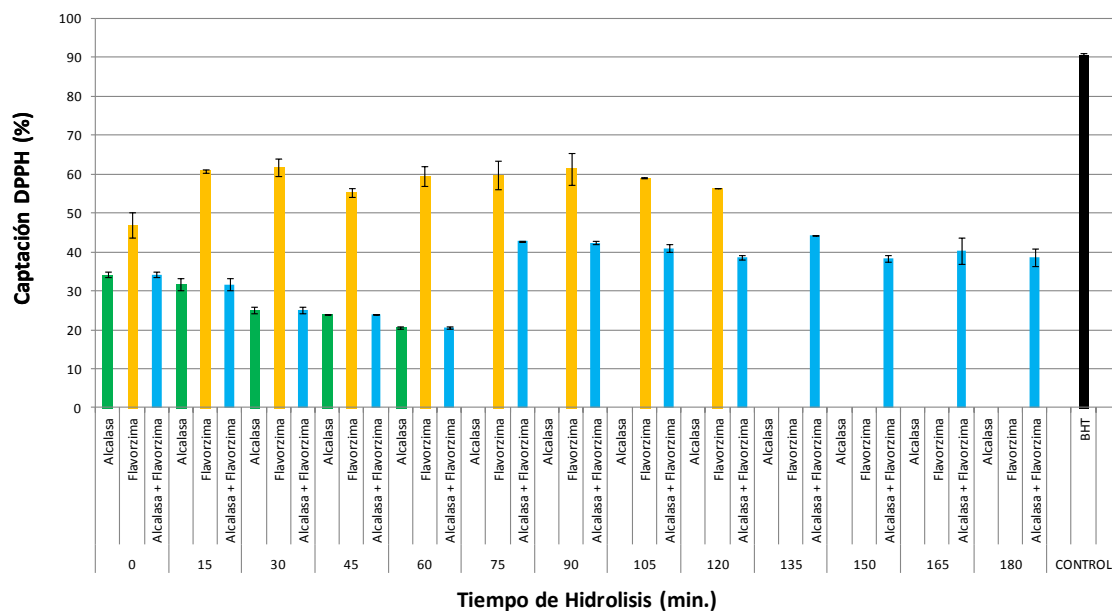
<b>Tabla 35. Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos</b>				
Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	$0.3657 \pm 0.00060$	c	p<0.01
	15	$0.4206 \pm 0.00000$	d	
	30	$0.2549 \pm 0.00020$	a	
	45	$0.3527 \pm 0.00015$	d	
	60	$0.5855 \pm 0.00011$	e	
<b>Flavorzima</b>	0	$0.4492 \pm 0.00038$	d	p<0.01
	15	$0.5510 \pm 0.00022$	i	
	30	$0.5239 \pm 0.00035$	h	
	45	$0.4823 \pm 0.00012$	e	
	60	$0.4863 \pm 0.00000$	f	
	75	$0.4917 \pm 0.00024$	g	
	90	$0.4367 \pm 0.00000$	c	
	105	$0.4056 \pm 0.00097$	b	
	120	$0.3001 \pm 0.00018$	a	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	$0.3657 \pm 0.00015$	c	p<0.01
	15	$0.4206 \pm 0.00027$	f	
	30	$0.2549 \pm 0.00123$	a	
	45	$0.3527 \pm 0.00031$	b	
	60	$0.5855 \pm 0.00043$	l	
	75	$0.4700 \pm 0.00012$	g	
	90	$0.4140 \pm 0.00000$	e	
	105	$0.4803 \pm 0.00024$	h	
	120	$0.4835 \pm 0.00012$	i	
	135	$0.3746 \pm 0.00029$	d	
	150	$0.4913 \pm 0.00042$	k	
	165	$0.4810 \pm 0.00019$	h	
	180	$0.4870 \pm 0.00044$	j	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la captación de DPPH.



En lo que respecta a la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd., esta puede observarse en la Figura 29.



**Figura 29.** Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd.

En similitud con lo anteriormente descrito, se observa que en los diferentes hidrolizados obtenidos empleando Alcalasa y Flavorzima, el efecto antioxidante es bastante inferior en comparación al control positivo BHT (90.58%), siendo los hidrolizados obtenidos con Flavorzima los que han presentado un mayor porcentaje de captación de DPPH (cerca del 60%). La baja capacidad antioxidante se encuentra en concordancia a lo descrito por **Aluko y Monu (2003)**, quienes a través de la ultrafiltración demostraron que únicamente las fracciones de bajo peso molecular de los hidrolizados de quínoa son las que presentan una alta capacidad secuestrante del DPPH, siendo el permeado de <5 kDa el de mayor actividad.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de quínoa obtenidos con una hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos (Tabla 36):

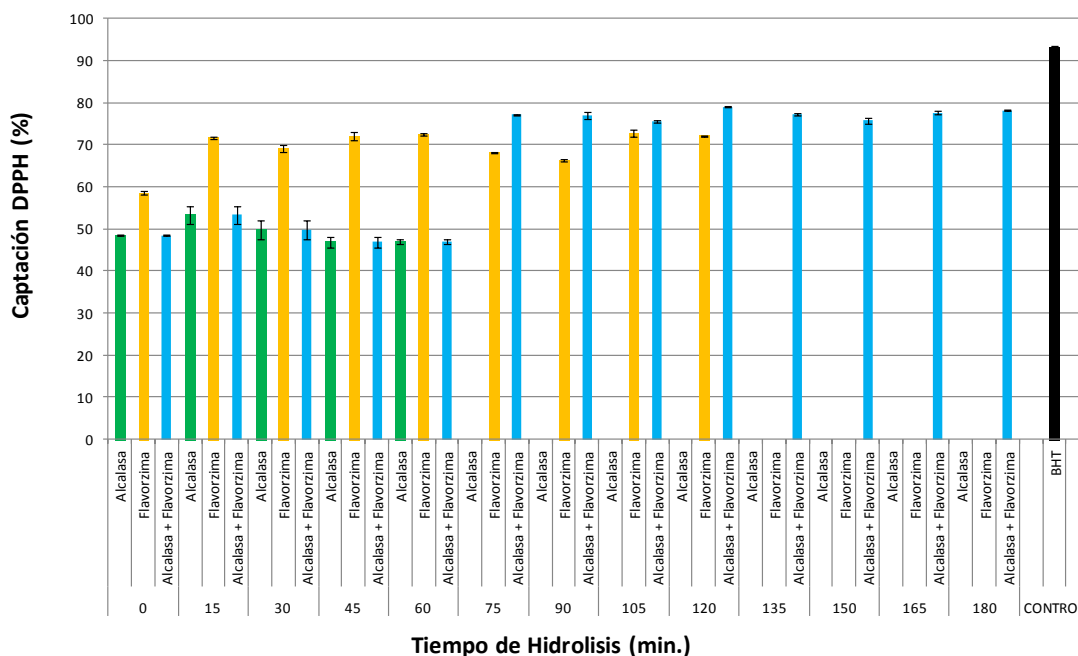
**Tabla 36. Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.6245 ± 0.00028	e	p<0.01
	15	0.5966 ± 0.00016	d	
	30	0.5241 ± 0.00058	c	
	45	0.5129 ± 0.00041	b	
	60	0.4715 ± 0.00043	a	
<b>Flavorzima</b>	0	0.7536 ± 0.00032	a	p<0.01
	15	0.8942 ± 0.00016	g	
	30	0.9030 ± 0.00026	i	
	45	0.8375 ± 0.00010	b	
	60	0.8808 ± 0.00031	e	
	75	0.8834 ± 0.00021	f	
	90	0.8997 ± 0.00026	h	
	105	0.8753 ± 0.00037	d	
	120	0.8486 ± 0.00025	c	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.6245 ± 0.00028	e	p<0.01
	15	0.5966 ± 0.00016	d	
	30	0.5241 ± 0.00058	c	
	45	0.5129 ± 0.00041	b	
	60	0.4715 ± 0.00043	a	
	75	0.7126 ± 0.00020	k	
	90	0.7088 ± 0.00021	j	
	105	0.6944 ± 0.00016	i	
	120	0.6705 ± 0.00016	g	
	135	0.7282 ± 0.00020	l	
	150	0.6675 ± 0.00027	f	
	165	0.6878 ± 0.00010	h	
	180	0.6702 ± 0.00031	g	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la captación de DPPH.

Por otra parte, la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L. se muestra en la Figura 30.



**Figura 30.** Cinética de captación del DPPH de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L.

Caso contrario ocurre con *S. hispanica* L., en donde se observa que en los hidrolizados obtenidos empleando Flavorzima, el efecto antioxidante es ligeramente inferior en comparación al control positivo BHT (93.12%), presentando porcentajes de captación de DPPH entre el 70-80%. Estos resultados son similares a los observados por **Orona-Tamayo et al. (2015)**, quienes describen que la fracción proteica presente con mayor capacidad antioxidante es la globulina seguida de la albúmina, mientras que las fracciones que requieren de una mayor concentración peptídica para inhibir al DPPH son las prolaminas y glutelinas.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de chíá obtenidos con una hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos (Tabla 37):

<b>Tabla 37. Estadística descriptiva y ANOVA de la cinética de captación de DPPH empleando hidrolizados proteicos de Chíá obtenidos con diferentes enzimas a diferentes tiempos</b>				
<b>Enzima</b>	<b>Tiempo</b>	$\bar{X} \pm DE$	<b>Tukey</b>	<b>Valor P</b>
<b>Alcalasa</b>	0	0.7703 ± 0.00020	c	p<0.01
	15	0.8184 ± 0.00015	e	
	30	0.7834 ± 0.00021	d	
	45	0.7536 ± 0.00030	a	
	60	0.7552 ± 0.00020	b	
<b>Flavorzima</b>	0	0.8712 ± 0.00027	a	p<0.01
	15	1.0092 ± 0.00017	e	
	30	0.9808 ± 0.00044	d	
	45	1.0133 ± 0.00028	f	
	60	1.0190 ± 0.00034	h	
	75	0.9716 ± 0.00033	c	
	90	0.9508 ± 0.00032	b	
	105	1.0229 ± 0.00034	i	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	120	1.0145 ± 0.00039	g	p<0.01
	0	0.7703 ± 0.00020	c	
	15	0.8184 ± 0.00015	e	
	30	0.7834 ± 0.00021	d	
	45	0.7536 ± 0.00030	a	
	60	0.7552 ± 0.00020	b	
	75	1.0729 ± 0.00036	i	
	90	1.0695 ± 0.00024	h	
	105	1.0540 ± 0.00036	f	
	120	1.0945 ± 0.00032	l	
	135	1.0729 ± 0.00018	i	
	150	1.0554 ± 0.00023	g	
	165	1.0783 ± 0.00025	j	
180	1.0848 ± 0.00018	k		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la captación de DPPH.

De este modo, la actividad antioxidante de estos péptidos contra DPPH podría provenir de su hidrólisis extensiva, lo que da lugar a la formación de péptidos más cortos que podrían obstaculizar su capacidad como donadores de electrones (Siew y Gan, 2013), siendo la Flavorzima la de mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, como puede observarse en la Tabla 38, dicha actividad también puede estar relacionada con la presencia de cantidades elevadas de aminoácidos hidrofóbicos (Val, Pro, Gly, Ile, Tyr, Met, Leu y Phe) ya que estos son más susceptibles de ser oxidados, así como con el enriquecimiento de aminoácidos ácidos y sus amidas (Glu, Asp y Ans) presentes en la fracción globulina de estas proteínas (Sandoval-Oliveros y Paredes-Lopez, 2013).

**Tabla 38.** Composición aminoacídica de los hidrolizados proteicos Alcalasa 60 minutos de *A.*

*hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

Aminoácidos	<i>A. hypochondriacus</i> L. (mg/100 g)	<i>C. quinoa</i> Willd. (mg/100 g)	<i>S. hispanica</i> L. (mg/100 g)	FAO, 1985 (mg/100 g)
Asp + Asn	10.341 + 0.176	11.286 + 0.032	9.714 + 0.030	
Glu + Gln	17.919 + 0.443	15.324 + 0.155	17.743 + 0.140	
Serina	6.378 + 0.044	5.790 + 0.030	6.620 + 0.052	
Histidina	4.275 + 0.060	3.847 + 0.035	3.719 + 0.073	1.9
Glicina	6.355 + 0.032	5.702 + 0.060	4.957 + 0.048	
Treonina	3.874 + 0.025	4.353 + 0.025	4.025 + 0.080	3.4
Arginina	10.211 + 0.057	8.067 + 0.037	10.092 + 0.120	
Alanina	3.967 + 0.026	4.817 + 0.015	5.157 + 0.028	
Prolina	1.621 + 0.024	1.538 + 0.028	1.201 + 0.180	
Tirosina	7.984 + 0.240	7.552 + 0.209	7.928 + 0.264	
Valina	3.981 + 0.039	4.991 + 0.076	4.585 + 0.047	3.5
Metionina	0.382 + 0.045	0.360 + 0.015	0.448 + 0.016	2.5 <sup>a</sup>
Cisteina	1.820 + 0.029	1.466 + 0.038	2.380 + 0.067	
Isoleucina	3.931 + 0.060	4.398 + 0.096	3.335 + 0.045	2.8
Leucina	0.001 + 0.000	0.001 + 0.000	0.001 + 0.000	6.6
Fenilalanina	6.801 + 0.067	8.422 + 0.056	7.445 + 0.044	6.3 <sup>b</sup>
Lisina	5.432 + 0.104	5.486 + 0.134	5.679 + 0.056	5.8

a: Metionina + Cisteina

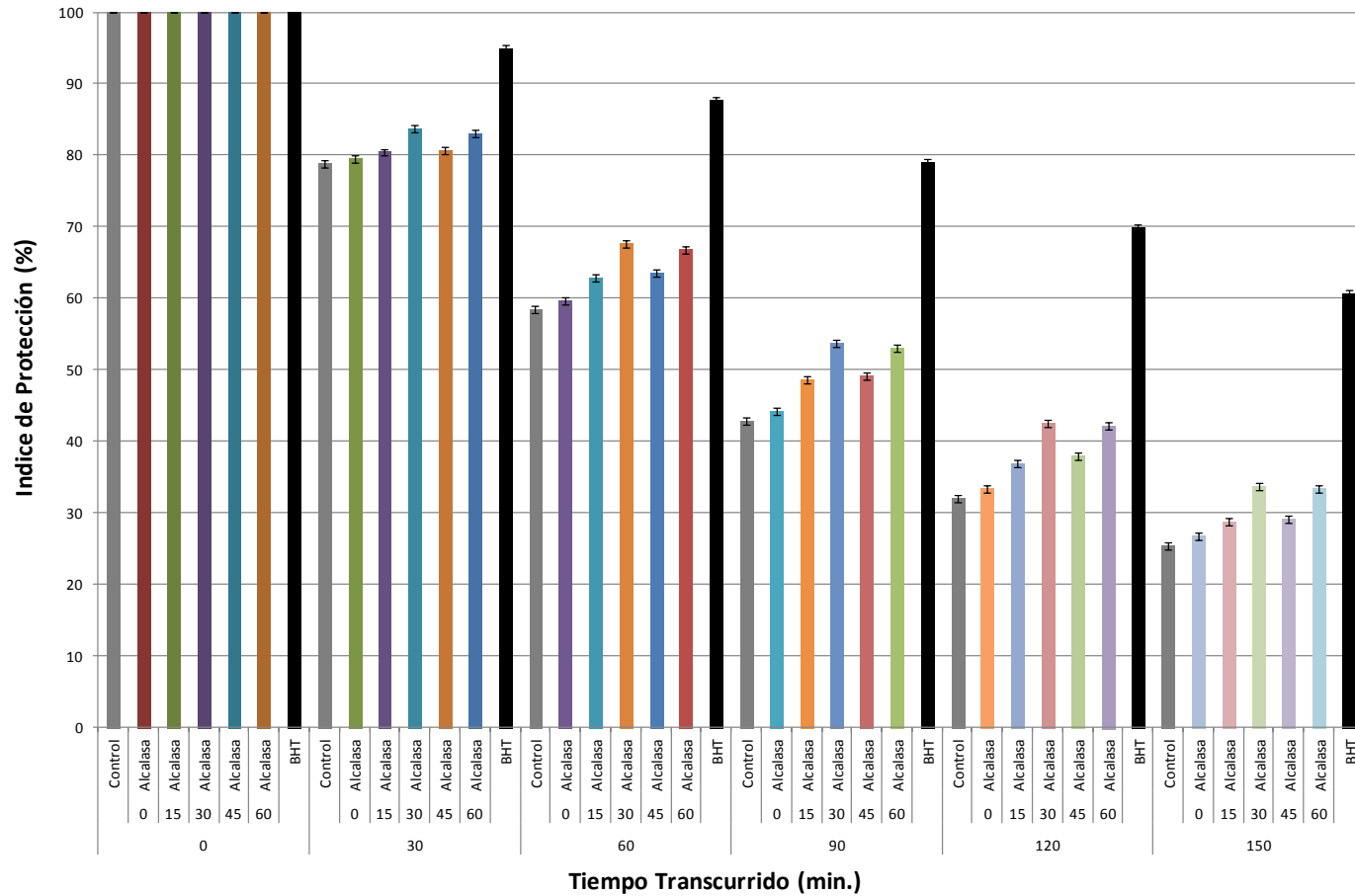
b: Fenilalanina + Tirosina

Los resultados (mg/100 g) están expresados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes

### 7.5.1.2 Decoloración del beta caroteno

El método mide la capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica, en el que un sistema modelo de  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico experimenta una rápida decoloración en ausencia de un antioxidante. El radical libre del ácido linoleico formado por la extracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metileno ataca las moléculas de  $\beta$ -caroteno, las cuales pierden los dobles enlaces y por lo tanto su color naranja característico. La velocidad de blanqueo de la solución de  $\beta$ -caroteno se mide por la diferencia entre la lectura inicial en absorbancia espectral a 470 nm (**Juntachote y Berghofer, 2005**). En otras palabras, el ensayo se basa en determinar espectrofotométricamente la decoloración que sufre el  $\beta$ -caroteno por la acción de los productos de oxidación del ácido linoleico. Este método es simple, reproducible y eficiente para una rápida evaluación de propiedades antioxidantes. La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método descrito por **Miller (1971)**. Como control positivo se utilizó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 0.1 mg/mL. Se evaluaron los hidrolizados proteicos a una concentración de 1 mg Prot/mL obtenidos a distintos tiempos empleando hidrólisis extensiva con Alcalasa y Flavorzima, así como su hidrólisis secuencial, de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

La capacidad antioxidante (índice de protección) de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L., de *C. quinoa* Willd. y de *S. hispanica* L. se muestra en las Figuras 31-33, 34-36 y 37-39, respectivamente.



**Figura 31.** Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L. (Alcalasa)

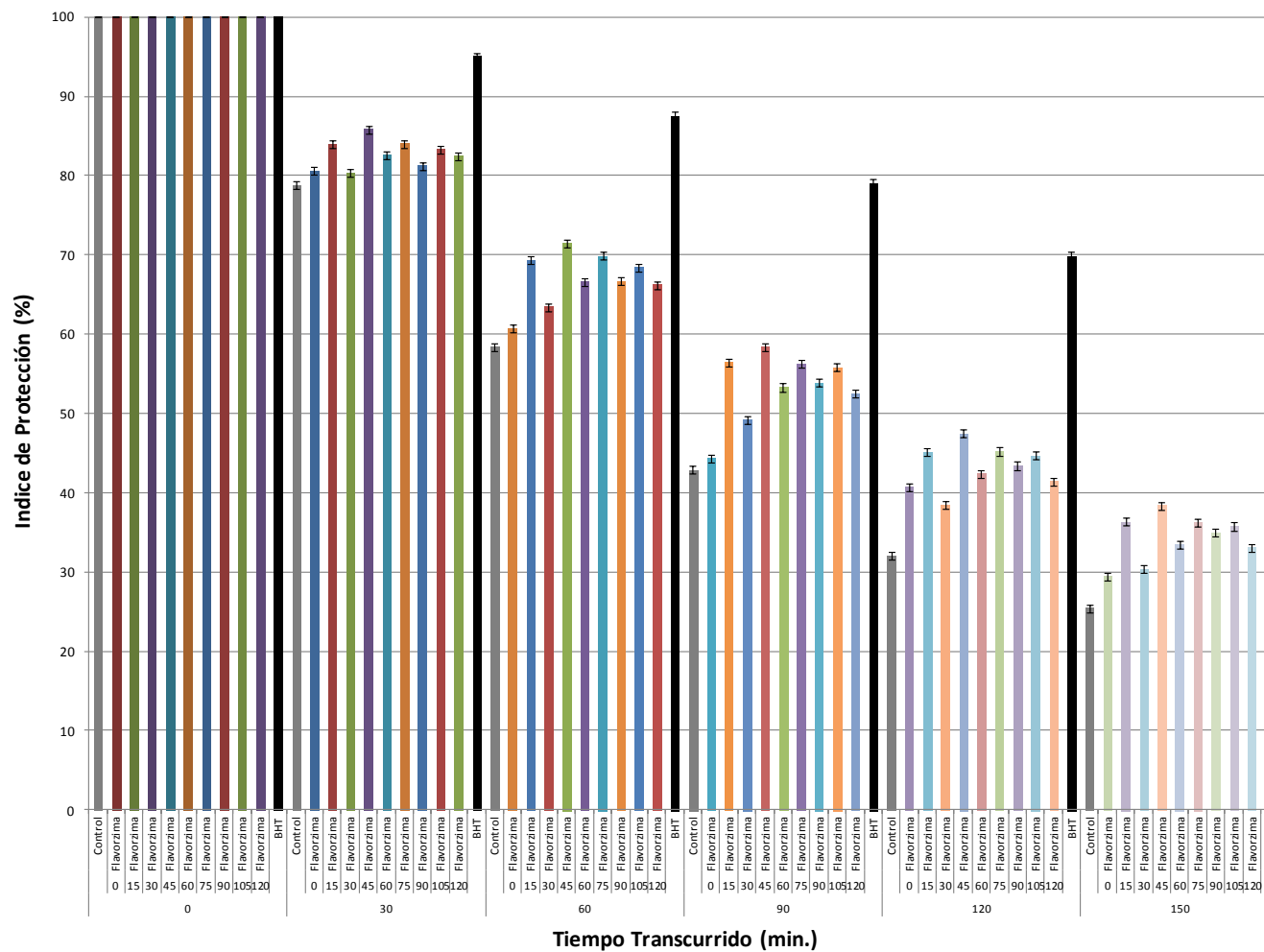


Figura 32. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L. (Flavorzima)



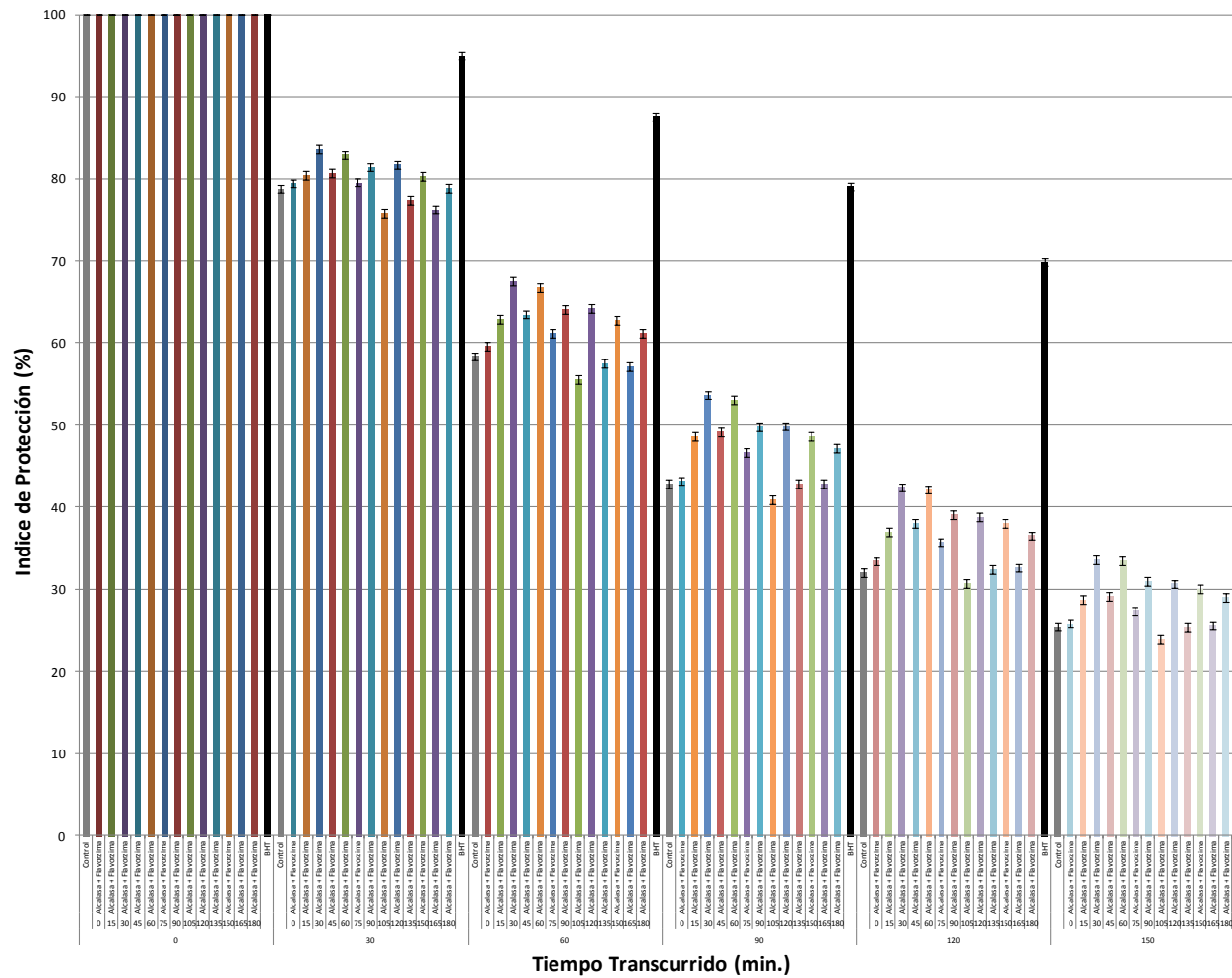
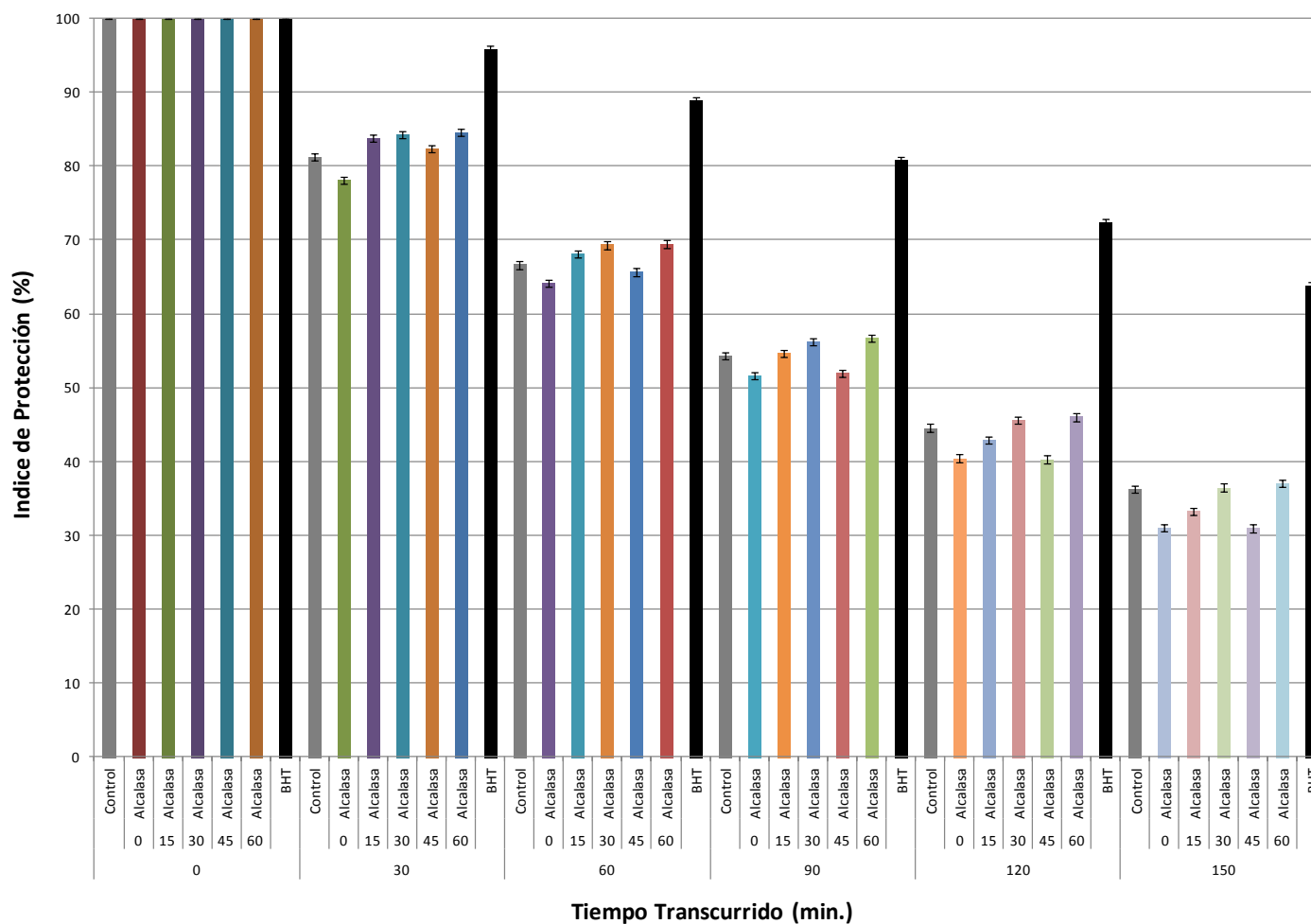


Figura 33. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L. (Alcalasa + Flavorzima)



**Figura 34.** Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd. (Alcalasa)

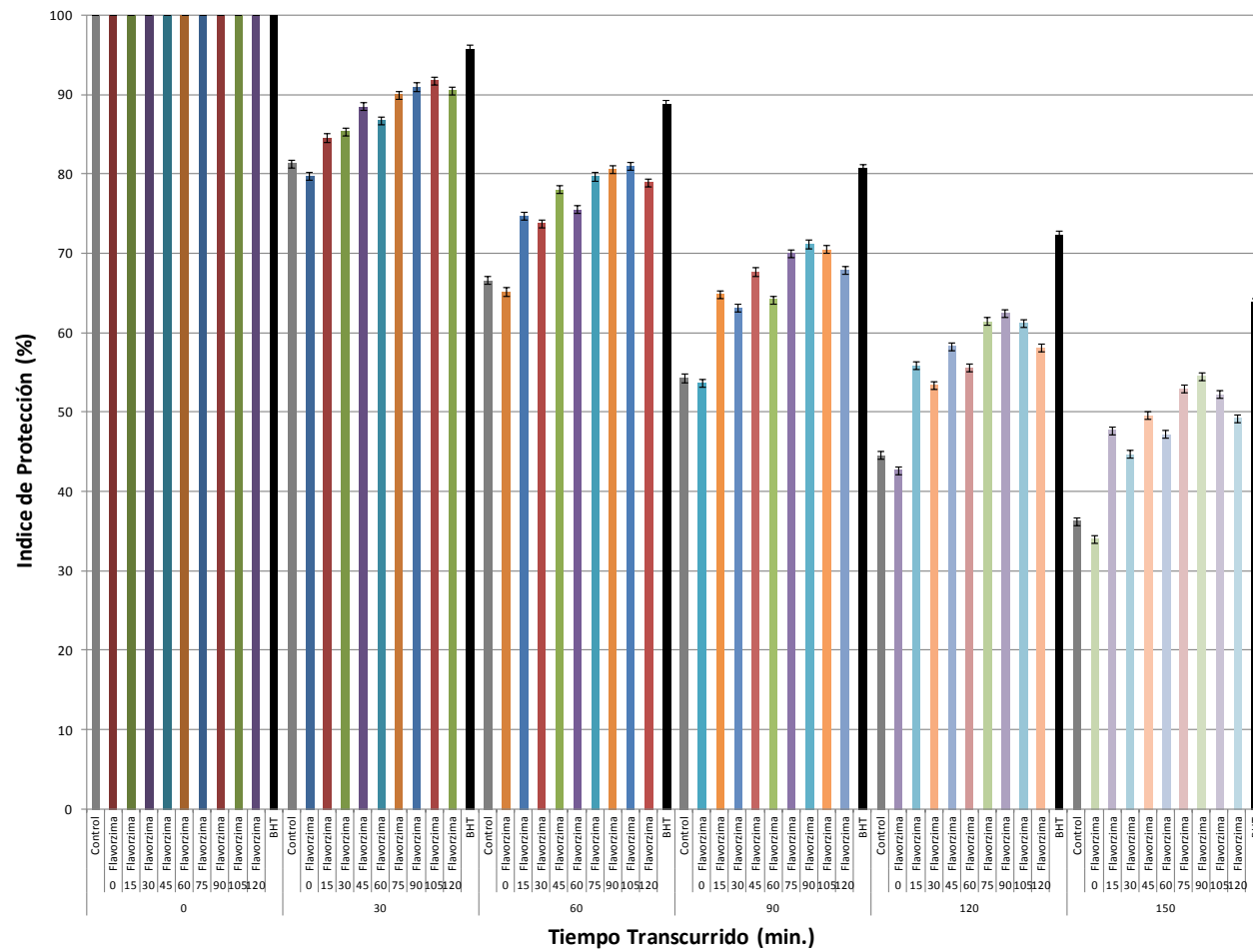


Figura 35. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd. (Flavorzima)

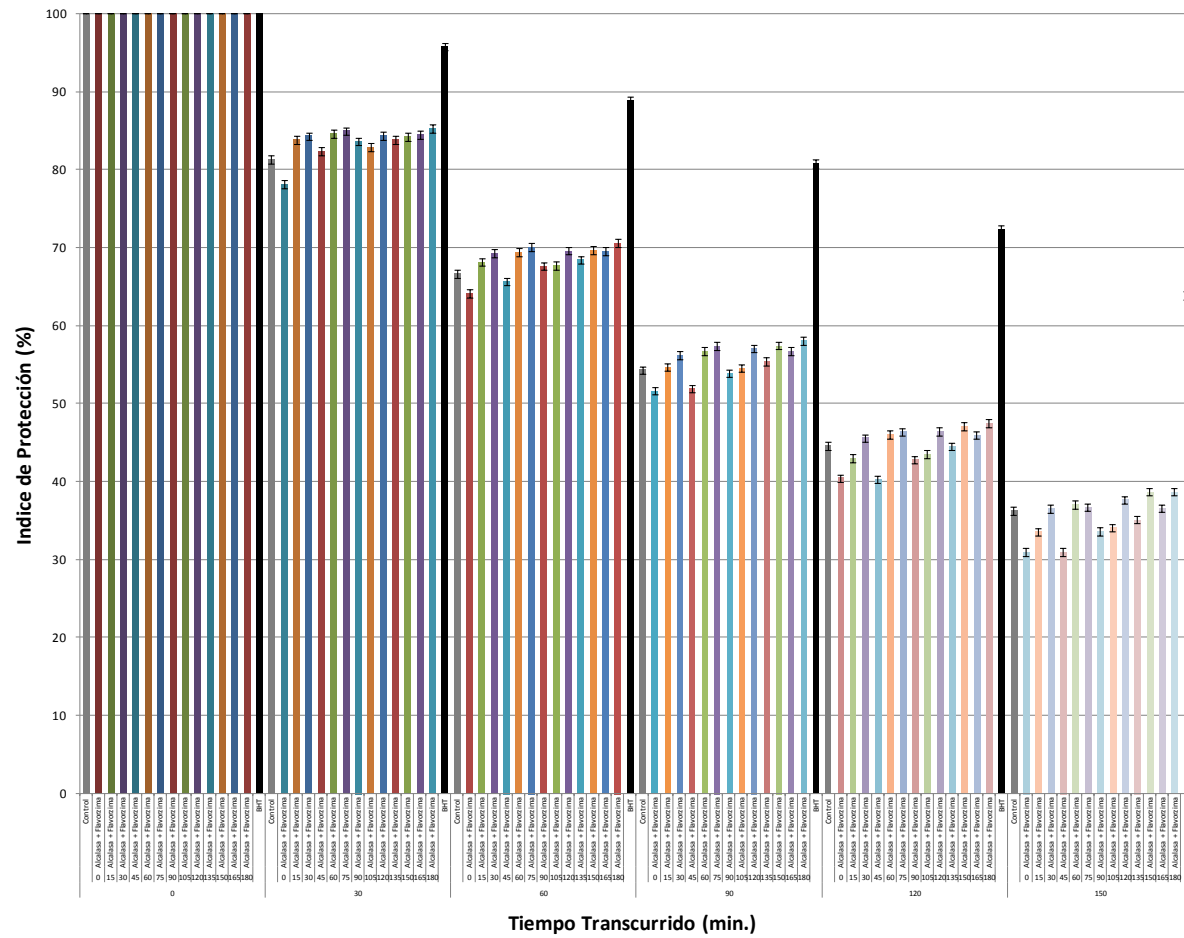
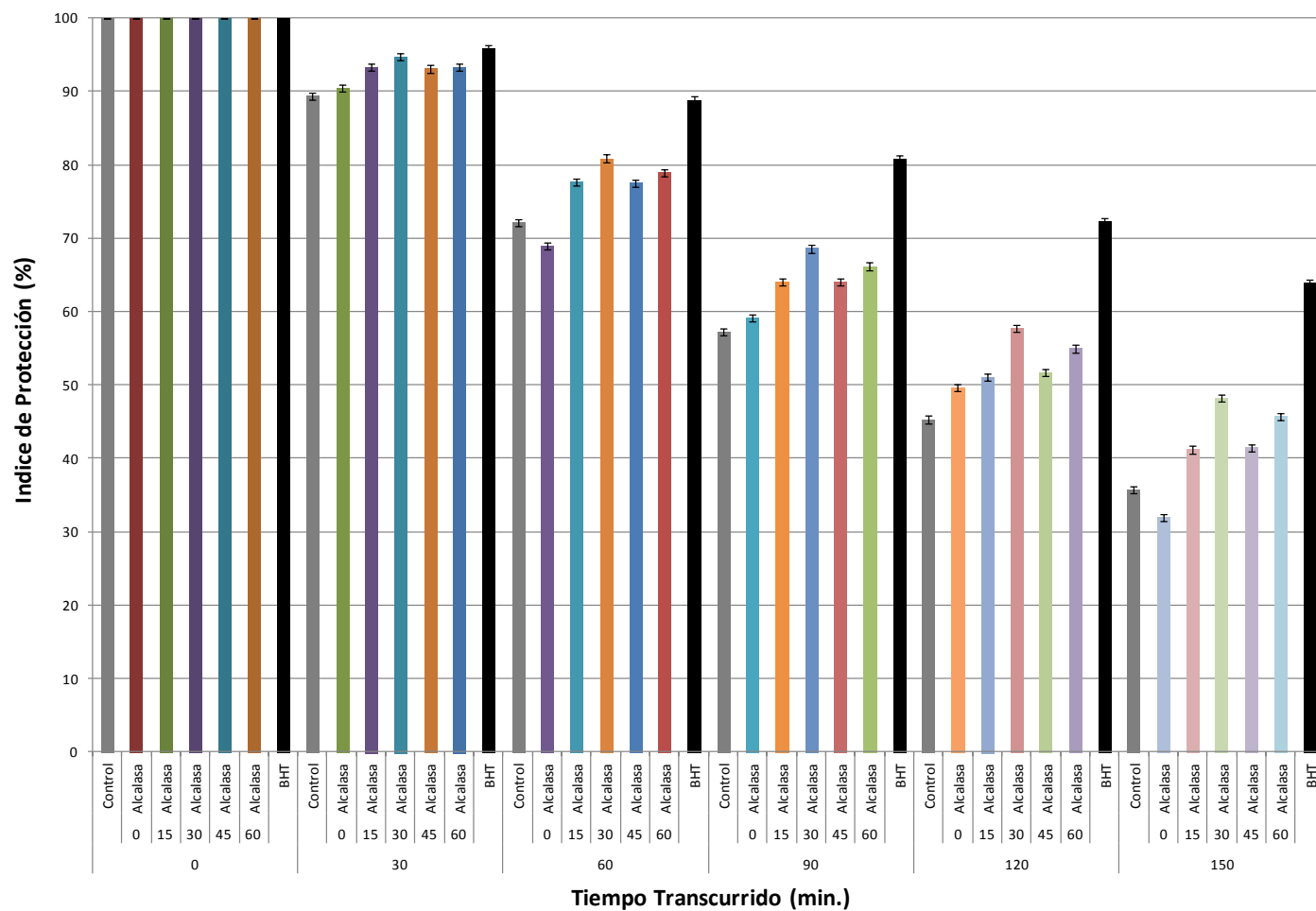


Figura 36. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd. (Alcalasa + Flavorzima)



**Figura 37.** Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L. (Alcalasa)

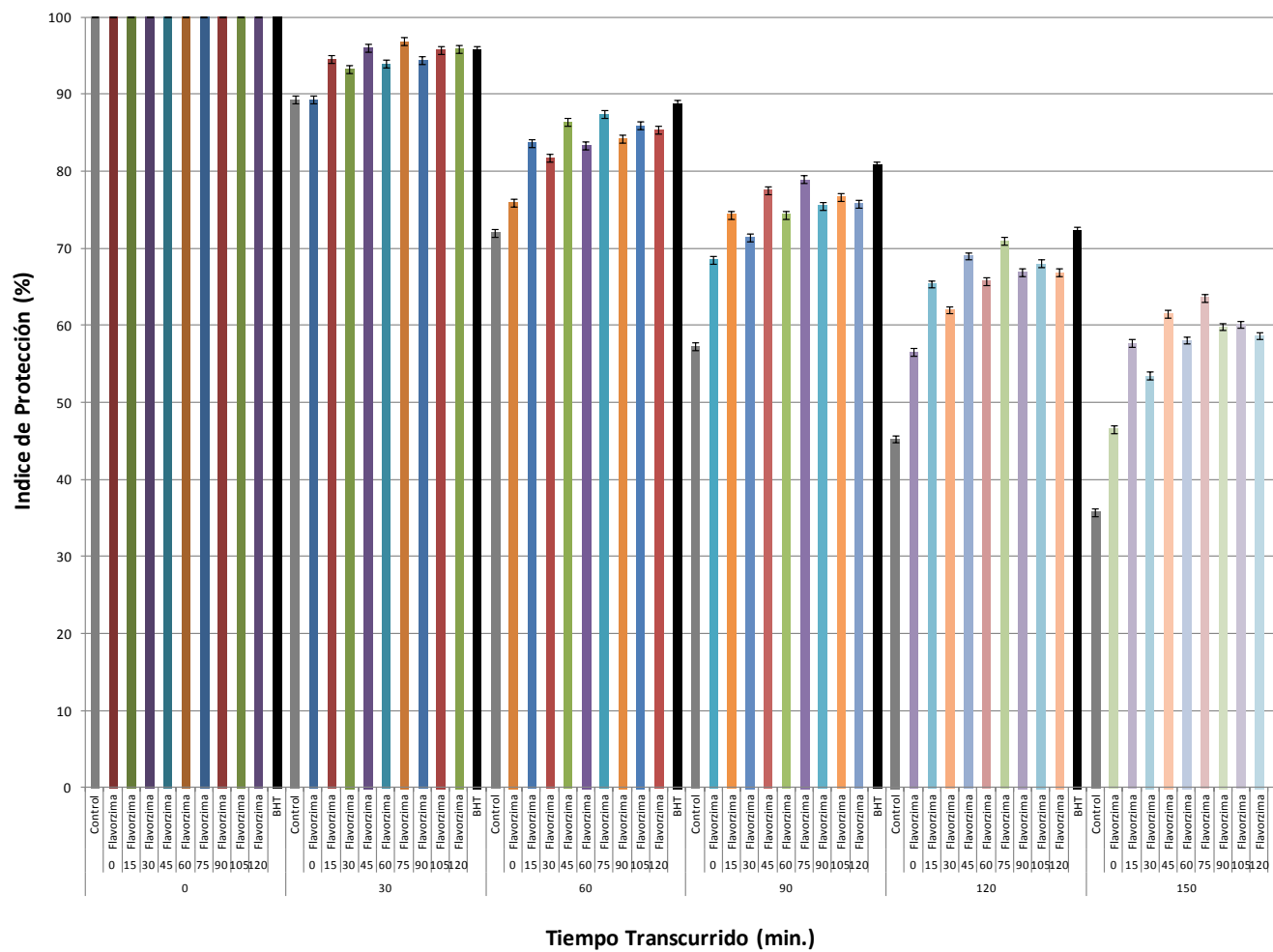


Figura 38. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L. (Flavorzima)

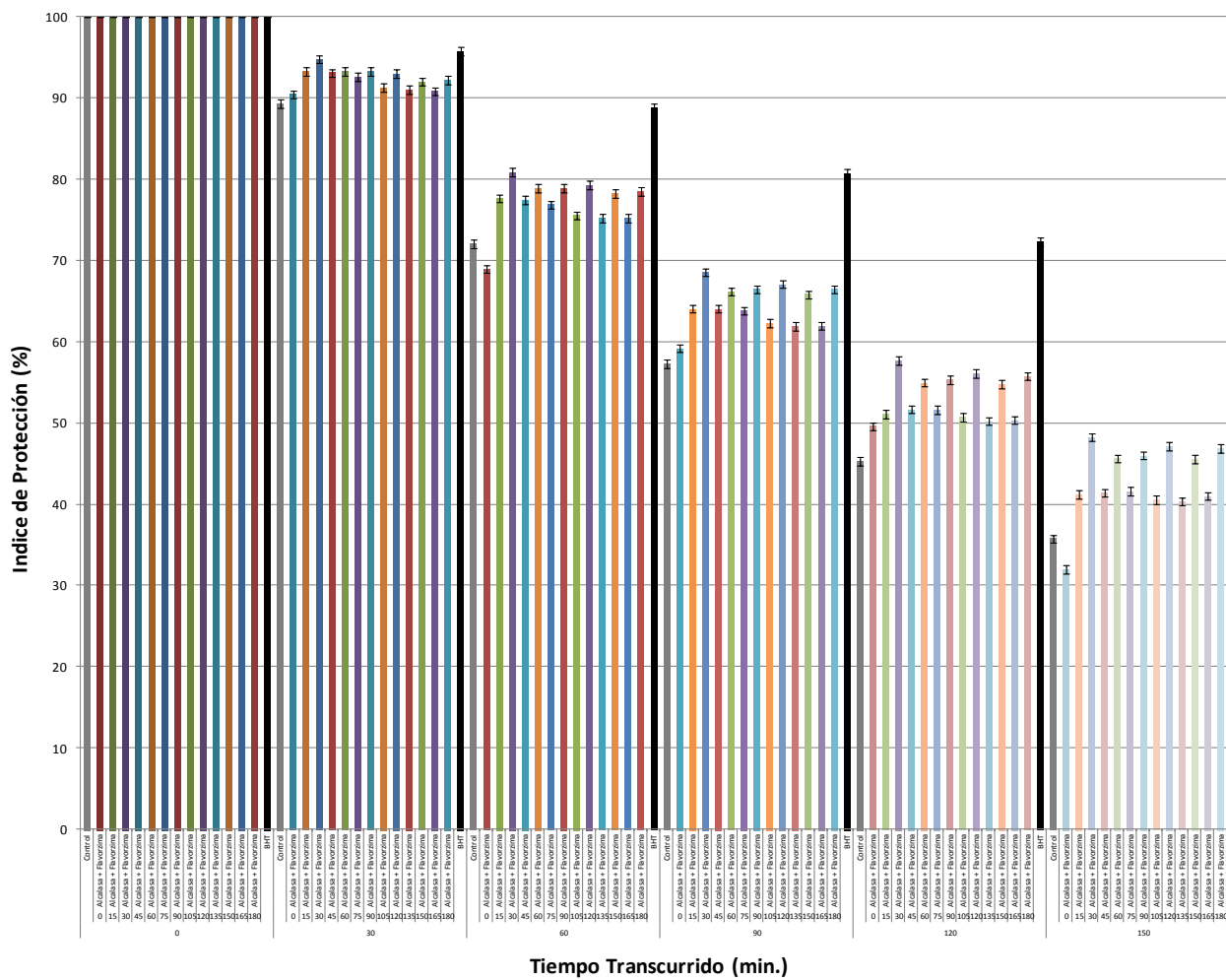


Figura 39. Índice de protección a través del tiempo de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L. (Alcalasa + Flavorzima)

Como puede observarse en las Figuras 31-33, los hidrolizados de *A. hypochondriacus* L. que han presentado mayor capacidad antioxidante por tratamiento enzimático trascurridos 120 minutos son la Flavorzima 45 minutos (47.45%), seguido de Alcalasa 30 minutos (42.43%) y Alcalasa-Flavorzima 30 minutos (42.43%). A pesar de que este valor es superior al del control negativo (32.02%), no existe un notable efecto antioxidante, puesto que el porcentaje es sumamente inferior al índice de protección presente en el BHT (69.87%).

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno (índice de protección) a diferentes tiempos de determinación y a diferentes tiempos de hidrólisis empleando hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos con Alcalasa, Flavorzima y Alcalasa + Flavorzima (Tabla 39 y 40):

**Tabla 39. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Amaranto**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.1519 ± 0.08350	e	
	60	0.9601 ± 0.10974	d	
	90	0.8175 ± 0.12241	c	
	120	0.7058 ± 0.12493	b	
	150	0.6197 ± 0.11898	a	
<b>Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.1559 ± 0.06563	e	
	60	0.9735 ± 0.08563	d	
	90	0.8341 ± 0.09648	c	
	120	0.7311 ± 0.09261	b	
	150	0.6402 ± 0.08999	a	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.1217 ± 0.06594	e	
	60	0.9231 ± 0.08513	d	
	90	0.7793 ± 0.09316	c	
	120	0.6694 ± 0.09386	b	
	150	0.5854 ± 0.08880	a	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)



La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa ( $p < 0.01$ ) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en los tiempo de determinación de la decoloración del beta caroteno.

**Tabla 40. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Amaranth obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos de hidrolisis**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	Control negativo	$0.8960 \pm 0.36357$	a	$p < 0.01$
	0	$0.9066 \pm 0.35831$	b	
	15	$0.9315 \pm 0.34595$	c	
	30	$0.9735 \pm 0.32768$	f	
	45	$0.9365 \pm 0.34344$	d	
	60	$0.9686 \pm 0.32800$	e	
	Control positivo	$1.1840 \pm 0.23241$	g	
<b>Flavorzima</b>	Control negativo	$0.8959 \pm 0.36368$	a	$p < 0.01$
	0	$0.9288 \pm 0.34394$	b	
	15	$0.9909 \pm 0.31633$	h	
	30	$0.9389 \pm 0.33973$	f	
	45	$1.0102 \pm 0.30996$	j	
	60	$0.9677 \pm 0.32755$	e	
	75	$0.9920 \pm 0.31661$	i	
	90	$0.9706 \pm 0.32066$	f	
	105	$0.9853 \pm 0.31794$	g	
	120	$0.9634 \pm 0.32997$	d	
	Control positivo	$1.1834 \pm 0.23260$	k	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	Control negativo	$0.8960 \pm 0.36357$	d	$p < 0.01$
	0	$0.9066 \pm 0.35831$	e	
	15	$0.9315 \pm 0.34595$	h	
	30	$0.9735 \pm 0.32768$	m	
	45	$0.9365 \pm 0.34344$	j	
	60	$0.9686 \pm 0.32800$	l	
	75	$0.9190 \pm 0.35137$	f	
	90	$0.9452 \pm 0.33846$	k	
	105	$0.8768 \pm 0.36782$	a	
	120	$0.9453 \pm 0.33986$	k	
	135	$0.8923 \pm 0.36188$	c	
	150	$0.9351 \pm 0.34190$	i	
	165	$0.8901 \pm 0.36027$	b	
180	$0.9242 \pm 0.34636$	g		
Control positivo	$1.1838 \pm 0.23263$	n		

Letras diferentes marcan diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa ( $p < 0.01$ ) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno.

Si hay interacción altamente significativa ( $p < 0.01$ ) debido a los diferentes tiempos de determinación y de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno por la acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima.

Con respecto a los hidrolizados de *C. quinoa* Willd., puede observarse en las Figuras 34-36 que los hidrolizados con mayor capacidad antioxidante por tratamiento enzimático transcurridos 120 minutos son la Flavorzima 90 minutos (62.45%), seguido de Alcalasa-Flavorzima 180 minutos (47.45%) y Alcalasa 60 minutos (46.00%). El índice de protección presente en el hidrolizado obtenido con Flavorzima puede considerarse un antioxidante con capacidad moderada, dado que su valor es superior al del control negativo (44.54%), y bastante próximo a la capacidad antioxidante presente en el BHT (72.3%).

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno (índice de protección) a diferentes tiempos de determinación y a diferentes tiempos de hidrólisis empleando hidrolizados proteicos de quínoa obtenidos con Alcalasa, Flavorzima y Alcalasa + Flavorzima (Tabla 41 y 42):

**Tabla 41. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Quínoa**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.1704 ± 0.08484	e	
	60	0.9994 ± 0.09814	d	
	90	0.8691 ± 0.10519	c	
	120	0.7606 ± 0.10926	b	
	150	0.6619 ± 0.11485	a	
<b>Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.2191 ± 0.07253	e	
	60	1.0698 ± 0.07777	d	
	90	0.9525 ± 0.07975	c	
	120	0.8555 ± 0.08164	b	
	150	0.7655 ± 0.08802	a	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.1658 ± 0.05780	e	
	60	0.9902 ± 0.06726	d	
	90	0.8585 ± 0.07245	c	
	120	0.7498 ± 0.07531	b	
	150	0.6540 ± 0.07904	a	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en los tiempo de determinación de la decoloración del beta caroteno.

**Tabla 42. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos de hidrólisis**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	Control negativo	0.9696 $\pm$ 0.32380	c	p<0.01
	0	0.9441 $\pm$ 0.33169	a	
	15	0.9765 $\pm$ 0.32690	c	
	30	0.9924 $\pm$ 0.31612	d	
	45	0.9555 $\pm$ 0.33608	b	
	60	0.9958 $\pm$ 0.31440	d	
	Control positivo	1.2037 $\pm$ 0.22243	e	
<b>Flavorzima</b>	Control negativo	0.9696 $\pm$ 0.32380	b	p<0.01
	0	0.9619 $\pm$ 0.32218	a	
	15	1.0536 $\pm$ 0.27345	d	
	30	1.0421 $\pm$ 0.28466	c	
	45	1.0825 $\pm$ 0.26854	e	
	60	1.0584 $\pm$ 0.27747	d	
	75	1.1045 $\pm$ 0.25778	f	
	90	1.1163 $\pm$ 0.25407	g	
	105	1.1123 $\pm$ 0.26234	g	
	120	1.0891 $\pm$ 0.27289	e	
Control positivo	1.2037 $\pm$ 0.27658	h		
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	Control negativo	0.9696 $\pm$ 0.32380	c	p<0.01
	0	0.9441 $\pm$ 0.33169	a	
	15	0.9765 $\pm$ 0.32690	d	
	30	0.9924 $\pm$ 0.31612	f	
	45	0.9555 $\pm$ 0.33608	b	
	60	0.9958 $\pm$ 0.31440	fg	
	75	0.9989 $\pm$ 0.31450	fg	
	90	0.9742 $\pm$ 0.32698	cd	
	105	0.9760 $\pm$ 0.32360	cd	
	120	0.9987 $\pm$ 0.31152	fg	
	135	0.9841 $\pm$ 0.32044	e	
	150	1.0012 $\pm$ 0.30858	gh	
165	0.9949 $\pm$ 0.31521	fg		
180	1.0071 $\pm$ 0.30890	h		
Control positivo	1.2037 $\pm$ 0.22243	i		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno.

Si hay interacción altamente significativa ( $p < 0.01$ ) debido a los diferentes tiempos de determinación y de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno por la acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima.

En cambio, puede observarse en las Figuras 37-39 a los hidrolizados de *S. hispanica* L. que presentan mayor capacidad antioxidante por tratamiento enzimático transcurridos 120 minutos, siendo Flavorzima 75 minutos el de mayor porcentaje (70.96%), seguido de Alcalasa 30 minutos (57.71) y Alcalasa-Flavorzima 30 minutos (57.71%). Estos hidrolizados superan el valor del control negativo (45.27%), pero el hidrolizado Flavorzima 75 minutos presenta un notable efecto antioxidante, siendo ligeramente inferior al índice de protección presente en el BHT (72.3%), lo cual resalta la importancia del mismo como un potente antioxidante natural.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno (índice de protección) a diferentes tiempos de determinación y a diferentes tiempos de hidrólisis empleando hidrolizados proteicos de chíá obtenidos con Alcalasa, Flavorzima y Alcalasa + Flavorzima (Tabla 43 y 44):

**Tabla 43. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno a diferentes tiempos de determinación empleando hidrolizados proteicos de Chíá**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.3029 ± 0.04161	e	
	60	1.0839 ± 0.07603	d	
	90	0.9477 ± 0.08033	c	
	120	0.8333 ± 0.08523	b	
	150	0.7248 ± 0.09976	a	
<b>Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.3302 ± 0.05054	e	
	60	1.1519 ± 0.06278	d	
	90	1.0350 ± 0.06817	c	
	120	0.9334 ± 0.07622	b	
	150	0.8490 ± 0.08207	a	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	1.5708 ± 0.00000	f	p<0.01
	30	1.2935 ± 0.03166	e	
	60	1.0784 ± 0.05343	d	
	90	0.9395 ± 0.05703	c	
	120	0.8242 ± 0.06090	b	
	150	0.7230 ± 0.07045	a	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en los tiempo de determinación de la decoloración del beta caroteno.

**Tabla 44. Estadística descriptiva y ANOVA de la decoloración del beta caroteno empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos por hidrólisis extensiva y secuencial a diferentes tiempos de hidrolisis**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	Control negativo	1.0098 $\pm$ 0.32520	a	p<0.01
	0	1.0111 $\pm$ 0.32894	b	
	15	1.0636 $\pm$ 0.30919	c	
	30	1.1056 $\pm$ 0.28529	e	
	45	1.0635 $\pm$ 0.30719	c	
	60	1.0832 $\pm$ 0.29269	d	
	Control positivo	1.2038 $\pm$ 0.22260	f	
<b>Flavorzima</b>	Control negativo	1.0098 $\pm$ 0.32520	a	p<0.01
	0	1.0739 $\pm$ 0.27782	b	
	15	1.1509 $\pm$ 0.24819	e	
	30	1.1238 $\pm$ 0.26132	c	
	45	1.1824 $\pm$ 0.23680	i	
	60	1.1496 $\pm$ 0.24525	d	
	75	1.1995 $\pm$ 0.23098	j	
	90	1.1604 $\pm$ 0.23980	f	
	105	1.1741 $\pm$ 0.24075	h	
	120	1.1675 $\pm$ 0.24698	g	
Control positivo	1.2038 $\pm$ 0.22260	k		
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	Control negativo	1.0098 $\pm$ 0.32520	a	p<0.01
	0	1.0111 $\pm$ 0.32894	b	
	15	1.0636 $\pm$ 0.30919	g	
	30	1.1056 $\pm$ 0.28529	l	
	45	1.0635 $\pm$ 0.30719	g	
	60	1.0832 $\pm$ 0.29269	i	
	75	1.0607 $\pm$ 0.30582	f	
	90	1.0852 $\pm$ 0.29107	j	
	105	1.0481 $\pm$ 0.30761	e	
	120	1.0891 $\pm$ 0.28588	k	
	135	1.0445 $\pm$ 0.30837	c	
	150	1.0769 $\pm$ 0.28999	h	
165	1.0457 $\pm$ 0.30634	d		
180	1.0831 $\pm$ 0.28579	i		
Control positivo	1.2038 $\pm$ 0.22260	m		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno.

Si hay interacción altamente significativa ( $p < 0.01$ ) debido a los diferentes tiempos de determinación y de hidrólisis en la decoloración del beta caroteno por la acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima.

Como se ha mencionado anteriormente, este ensayo se basa en una reacción oxidativa en cadena en la que una molécula lipídica tras otra se oxida hasta el máximo posible para formar peróxidos lipídicos. Por tanto, el papel que ejercen los antioxidantes durante dicho proceso es reducir el radical peroxilo a hidroperóxido antes de que este se pueda propagar (**Schneider, 2009**). De acuerdo con esto, se puede observar como varía el efecto de inhibición de los hidrolizados peptídicos en las tres especies, siendo los obtenidos con Flavorzima los más cercanos al valor que exhibe el BHT y por tanto son los que sufren menor porcentaje de reducción conforme transcurre el tiempo entre cada lectura cuando se compararon con la reacción desinhibida que ocurre en el control negativo. Estos resultados son similares a los descritos por **Piotrowicz y Mellado (2015)**, quienes observaron que los hidrolizados obtenidos con Protamex y Alcalasa mostraban una relación directa entre la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico y el grado de hidrólisis en *Engraulis anchoita*. Sin embargo, la composición de aminoácidos a menudo prevalece y caracteriza la mejor actividad antioxidante (Tabla 38), lo que puede ser evidenciado por los hidrolizados obtenidos con la enzima Flavorzima, que presentan el grado más alto de hidrólisis (Figura 22-24) y la mayor actividad antioxidante (Figuras 32, 35 y 38). Aquí se involucra el hecho de que la Flavorzima, a diferencia de la Alcalasa, al ser una mezcla de endo- y exo- peptidasas, actúa más rápidamente en la formación de pequeños péptidos que son más susceptibles a ser oxidados, lo que podría explicar los porcentajes más altos obtenidos en ella. Otro hecho es el efecto del tiempo de incubación sobre el índice de protección, el cual podría



atribuirse a la inestabilidad y la descomposición del peróxido de hidrógeno en otros productos de oxidación secundaria, que conducen a una disminución de la absorbancia después de la incubación prolongada a 45°C durante el proceso (Chen *et al.*, 2007).

### 7.5.1.3 Poder reductor

El método mide la capacidad de un antioxidante para donar electrones al Fe (III). El ensayo se basa en determinar el aumento de absorbancia a 700 nm que sufre el ferricianuro en presencia de un antioxidante, el cual lo reduce a ferrocianuro, que al reaccionar con Fe<sup>3+</sup> forma ferrocianuro férrico (color verde). Cuanto mayor sea el valor del poder reductor del compuesto ensayado, mayor será la actividad antioxidante.

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método descrito por Oyaizu (1986). Como control positivo se utilizó el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 0.1 mg/mL. Se evaluaron los hidrolizados proteicos a una concentración de 1 mg Prot/mL obtenidos a distintos tiempos empleando hidrólisis extensiva con Alcalasa y Flavorzima, así como su hidrólisis secuencial, de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

La capacidad antioxidante (poder reductor) de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L., de *C. quinoa* Willd. y de *S. hispanica* L. se muestran en las Figuras 40, 41 y 42, respectivamente.

Como puede observarse en las Figuras 40 y 41, los hidrolizados de *A. hypochondriacus* L. y de *C. quinoa* Willd. han mostrado una pobre capacidad antioxidante, siendo principalmente los hidrolizados obtenidos con Flavorzima los que han presentado mayor valor en absorbancia respecto a los demás. En ambos casos, los

hidrolizados han alcanzado un valor cercano al 25% de poder reductor respecto del BHT y, a pesar de que este valor es cerca del doble del control negativo, no puede ser considerado como un efecto antioxidante de importancia.

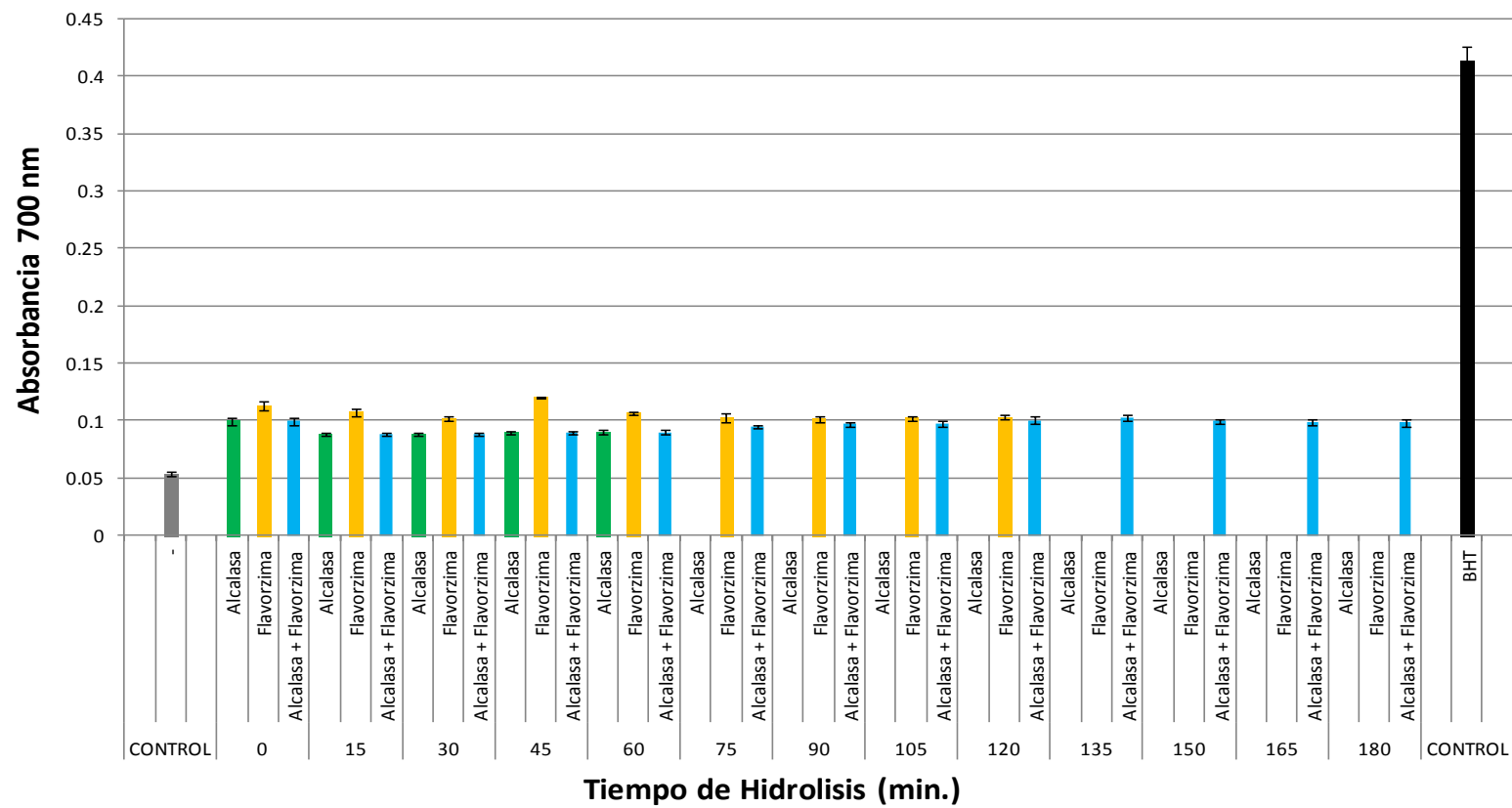
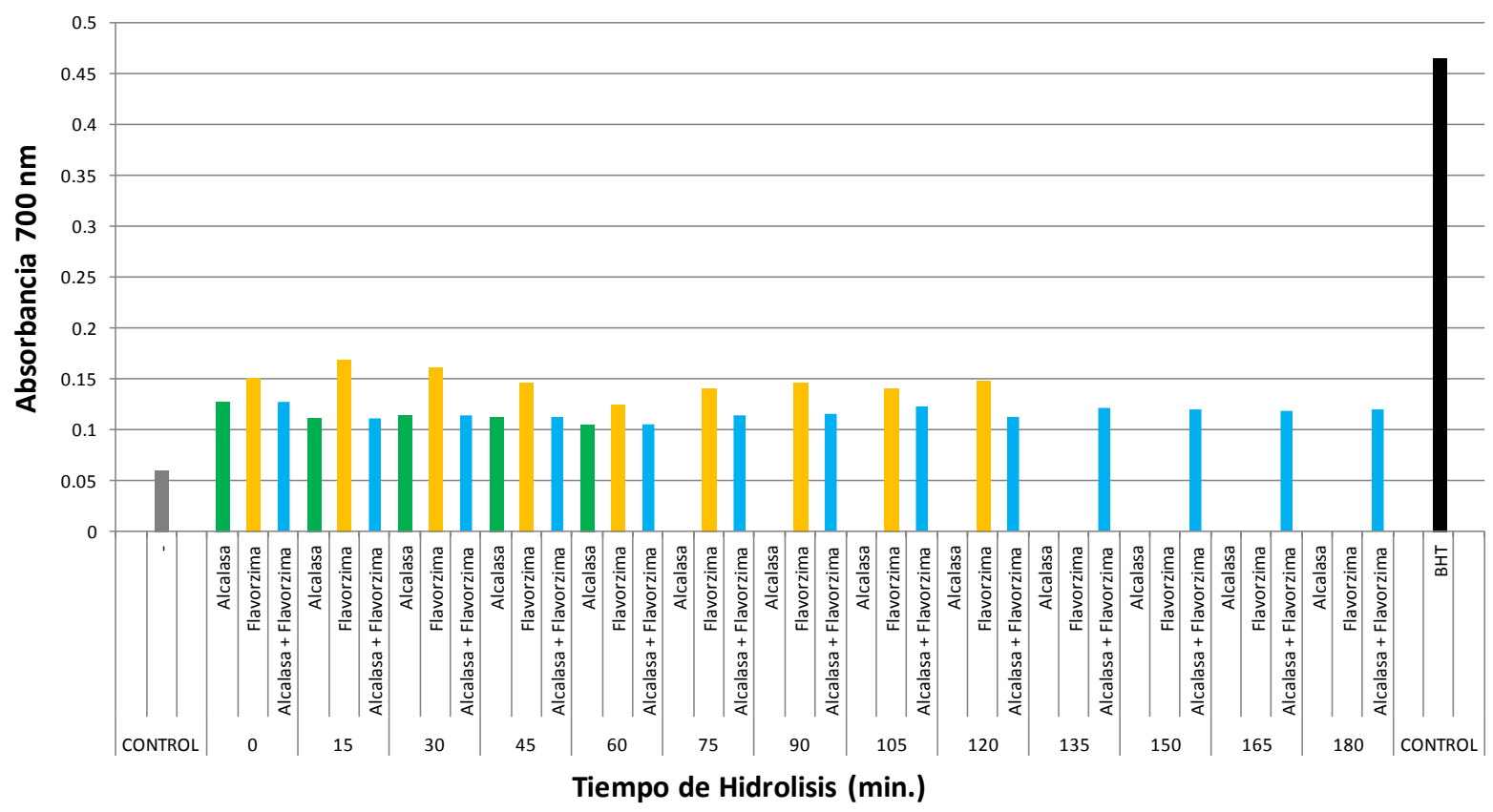


Figura 40. Poder reductor de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L.



**Figura 41.** Poder reductor de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd.

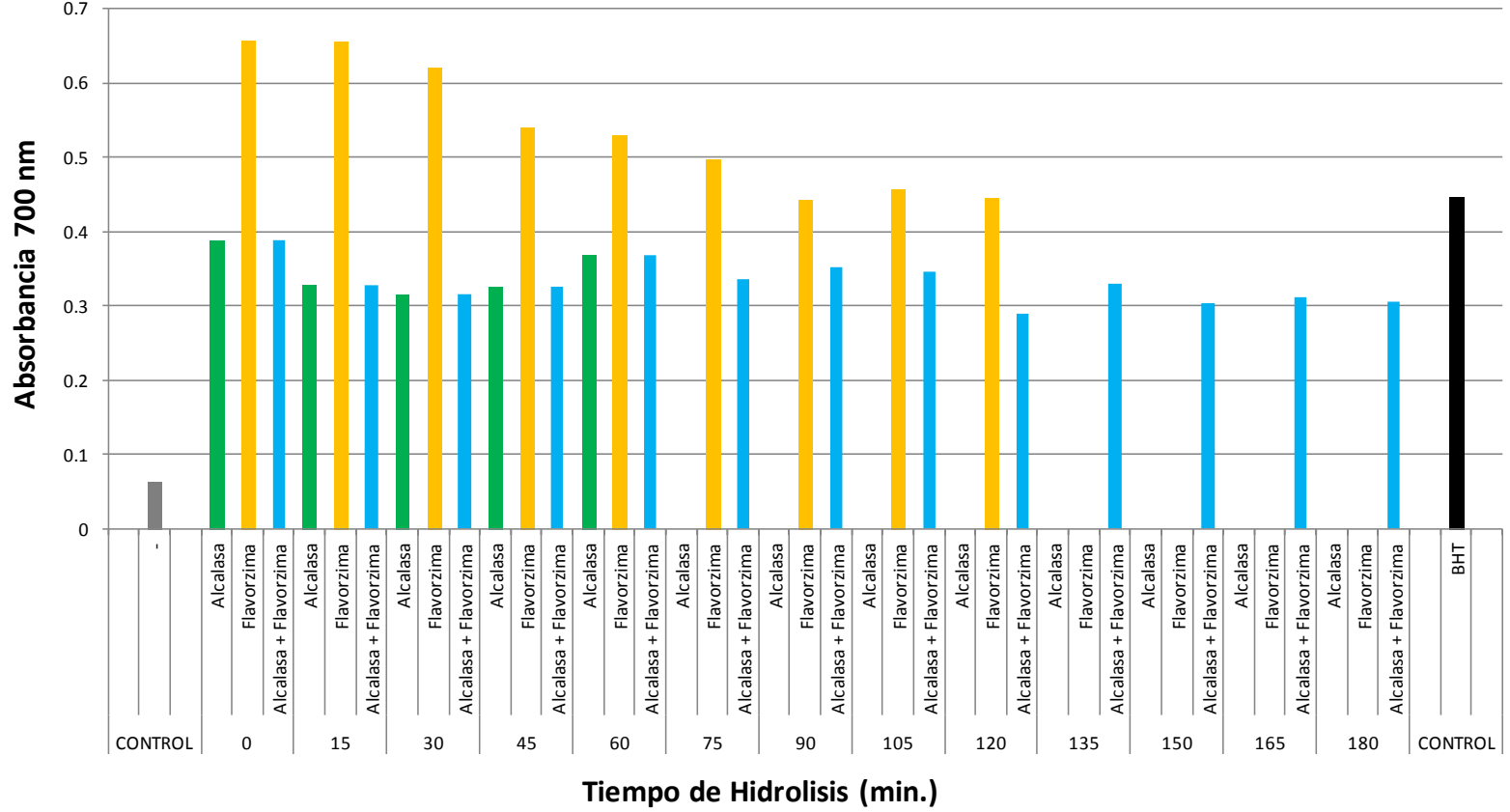


Figura 42. Poder reductor de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 45):

**Tabla 45. Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.098900 $\pm$ 0.0002000	c	p<0.01
	15	0.087667 $\pm$ 0.0003215	a	
	30	0.087900 $\pm$ 0.0002000	a	
	45	0.089733 $\pm$ 0.0004726	b	
	60	0.090400 $\pm$ 0.0004359	b	
<b>Flavorzima</b>	0	0.113367 $\pm$ 0.0003786	e	p<0.01
	15	0.107500 $\pm$ 0.0001732	d	
	30	0.101633 $\pm$ 0.0005033	a	
	45	0.120200 $\pm$ 0.0003606	f	
	60	0.106600 $\pm$ 0.0001000	c	
	75	0.102267 $\pm$ 0.0002082	ab	
	90	0.101533 $\pm$ 0.0003055	a	
	105	0.101800 $\pm$ 0.0005568	a	
	120	0.103033 $\pm$ 0.0002082	b	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.099267 $\pm$ 0.0001528	f	p<0.01
	15	0.088033 $\pm$ 0.0003215	a	
	30	0.088333 $\pm$ 0.0004933	a	
	45	0.089467 $\pm$ 0.0004041	b	
	60	0.089667 $\pm$ 0.0004041	b	
	75	0.094200 $\pm$ 0.0005568	c	
	90	0.096667 $\pm$ 0.0003215	d	
	105	0.097533 $\pm$ 0.0002517	de	
	120	0.100167 $\pm$ 0.0004041	g	
	135	0.102200 $\pm$ 0.0004359	h	
	150	0.100233 $\pm$ 0.0005686	g	
165	0.098300 $\pm$ 0.0002646	e		
180	0.098233 $\pm$ 0.0001528	e		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en el poder reductor.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 46):

**Tabla 46. Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.127467 $\pm$ 0.0002517	d	p<0.01
	15	0.111167 $\pm$ 0.0002082	b	
	30	0.113900 $\pm$ 0.0002000	c	
	45	0.111533 $\pm$ 0.0003786	b	
	60	0.105400 $\pm$ 0.0004359	a	
<b>Flavorzima</b>	0	0.151133 $\pm$ 0.0002517	e	p<0.01
	15	0.168533 $\pm$ 0.0003786	g	
	30	0.161400 $\pm$ 0.0005000	f	
	45	0.146533 $\pm$ 0.0005508	c	
	60	0.123500 $\pm$ 0.0004000	a	
	75	0.140733 $\pm$ 0.0003512	b	
	90	0.146533 $\pm$ 0.0003512	c	
	105	0.140700 $\pm$ 0.0002646	b	
	120	0.147833 $\pm$ 0.0001528	d	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.127467 $\pm$ 0.0002517	i	p<0.01
	15	0.111167 $\pm$ 0.0002082	b	
	30	0.113900 $\pm$ 0.0002000	d	
	45	0.111533 $\pm$ 0.0003786	b	
	60	0.105400 $\pm$ 0.0004359	a	
	75	0.113467 $\pm$ 0.0004509	d	
	90	0.114933 $\pm$ 0.0001528	e	
	105	0.122467 $\pm$ 0.0004509	h	
	120	0.112700 $\pm$ 0.0002646	c	
	135	0.121767 $\pm$ 0.0002517	h	
	150	0.120167 $\pm$ 0.0003055	g	
165	0.118833 $\pm$ 0.0003786	f		
180	0.120400 $\pm$ 0.0002000	g		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en el poder reductor.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de chíá obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 47):

**Tabla 47. Estadística descriptiva y ANOVA del poder reductor empleando hidrolizados proteicos de Chíá obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.388933 $\pm$ 0.0002082	e	p<0.01
	15	0.326633 $\pm$ 0.0001528	c	
	30	0.315867 $\pm$ 0.0001528	a	
	45	0.325800 $\pm$ 0.0002646	b	
	60	0.367533 $\pm$ 0.0002082	d	
<b>Flavorzima</b>	0	0.657300 $\pm$ 0.0001000	i	p<0.01
	15	0.655767 $\pm$ 0.0002309	h	
	30	0.619333 $\pm$ 0.0001528	g	
	45	0.539033 $\pm$ 0.0002517	f	
	60	0.529500 $\pm$ 0.0001000	e	
	75	0.496567 $\pm$ 0.0001528	d	
	90	0.443567 $\pm$ 0.0002082	a	
	105	0.457033 $\pm$ 0.0001528	c	
	120	0.444367 $\pm$ 0.0003055	b	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.388933 $\pm$ 0.0002052	m	p<0.01
	15	0.326633 $\pm$ 0.0001528	g	
	30	0.315867 $\pm$ 0.0001528	e	
	45	0.325800 $\pm$ 0.0002646	f	
	60	0.367533 $\pm$ 0.0002082	l	
	75	0.335433 $\pm$ 0.0002517	i	
	90	0.351200 $\pm$ 0.0005292	k	
	105	0.346767 $\pm$ 0.0002082	j	
	120	0.290433 $\pm$ 0.0002082	a	
	135	0.329433 $\pm$ 0.0002517	h	
	150	0.303300 $\pm$ 0.0002000	b	
	165	0.310967 $\pm$ 0.0002517	d	
	180	0.305433 $\pm$ 0.0003055	c	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en el poder reductor.



Estos resultados son bastante similares a los descritos por **Soriano-Santos y Escalona-Buendia (2015)**, quienes evaluaron la capacidad antioxidante de hidrolizados de la fracción albumina y globulina de *A. hypochondriacus* L. y observaron que en todos ellos el poder reductor era sumamente inferior al del control positivo, reportando valores de absorbancia entre 0.05 y 0.1. Esto demuestra la limitada capacidad para donar electrones por parte de estos hidrolizados, lo cual puede deberse a que la estructura terciaria de estas fracciones proteicas no tenga la suficiente exposición de los residuos aminoacídicos que son mayormente susceptibles de ser oxidados.

Por otra parte, en la Figura 42 se observa el contraste respecto a los resultados anteriormente descritos, donde los hidrolizados de *S. hispanica* L. han mostrado absorbancias muy por encima de las de *A. hypochondriacus* L. y *C. quinoa* Willd., lo que presume su gran poder reductor, llegando a presentar valores incluso superiores a los del control positivo BHT en los hidrolizados obtenidos con Flavorzima, lo cual resalta su importancia como un potente antioxidante natural gracias a su notable capacidad donadora de electrones. Este resultado indica que el poder reductor de los hidrolizados proteicos es influenciado principalmente por el tipo de enzima empleada durante la hidrólisis.

**Ambigaipalan et al. (2015)** observaron un comportamiento similar empleando hidrolizados proteicos obtenidos con Alcalasa, Flavorzima y Termolisina en semillas de dátil (*Phoenix dactylifera* L). Ellos demostraron que la combinación de enzimas producía hidrolizados proteicos con alto poder reductor. Por tanto, el aumento de la actividad antioxidante de sus péptidos debe estar relacionado con las propiedades que le proporciona su composición química y física. Esto puede sugerir que los péptidos de *S. hispanica* L. podrían ser empleados como fuente potencial de antioxidantes naturales.

En resumen, la actividad antioxidante de los péptidos puede verse influenciada por la secuencia de sus aminoácidos, por la cantidad de aminoácidos libres presentes, por el grado de hidrólisis, y por el peso molecular de los péptidos (**Intarasirisawat *et al.*, 2012**).

De acuerdo con **Elias *et al.* (2008)**, la actividad antioxidante de las proteínas, como se ha mencionado anteriormente, está relacionada con su composición aminoacídica. No obstante, esta propiedad puede estar un tanto restringida por su estructura terciaria, dado que muchos aminoácidos con potencial antioxidante (siendo los más reactivos aquellos que contienen cadenas laterales nucleófilas que contienen azufre, tales como Cys y Met, o cadenas laterales aromáticas, como Trp, Tyr y Phe) pueden estar encerrados dentro del núcleo proteico, donde son inaccesibles a los pro-oxidantes. Por tanto, la hidrólisis enzimática favorece su exposición aumentando con ello la actividad antioxidante de los péptidos.

De forma general, los resultados de los tres ensayos empleados para evaluar la capacidad antioxidante han indicado que las propiedades antioxidantes de los hidrolizados dependen de las enzimas empleadas durante la hidrólisis. Por ejemplo, los hidrolizados preparados a partir de la proteína de *S. hispanica* L. usando Flavorzima mostraron mayor actividad antioxidante, mientras que los hidrolizados preparados con una combinación de Alcalasa y Flavorzima no difieren en la eficacia antioxidante de los generados únicamente por Alcalasa.

Otros factores que deben ser considerados durante la evaluación de la capacidad antioxidante son la genética, los procesos agrotécnicos y las condiciones ambientales de las semillas que se empleen.

### 7.5.2 Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una enzima clave del sistema renina-angiotensina que regula la presión sanguínea en el organismo debido a que escinde la angiotensina I en el potente vasoconstrictor angiotensina II, que también promueve la retención de sal. La ECA también inactiva la bradiquinina vasodilatadora mediante la eliminación secuencial de dos dipeptidos C-terminales (**Sentandreu y Toldrá, 2006**). Por lo tanto, el efecto general de la actividad ECA es una elevación de la presión arterial. En este sentido, el descubrimiento de compuestos capaces de suprimir fuertemente la actividad ECA representa una estrategia exitosa para el tratamiento de la hipertensión, una de las enfermedades crónicas más extendidas en los países desarrollados (**Houston, 2002**).

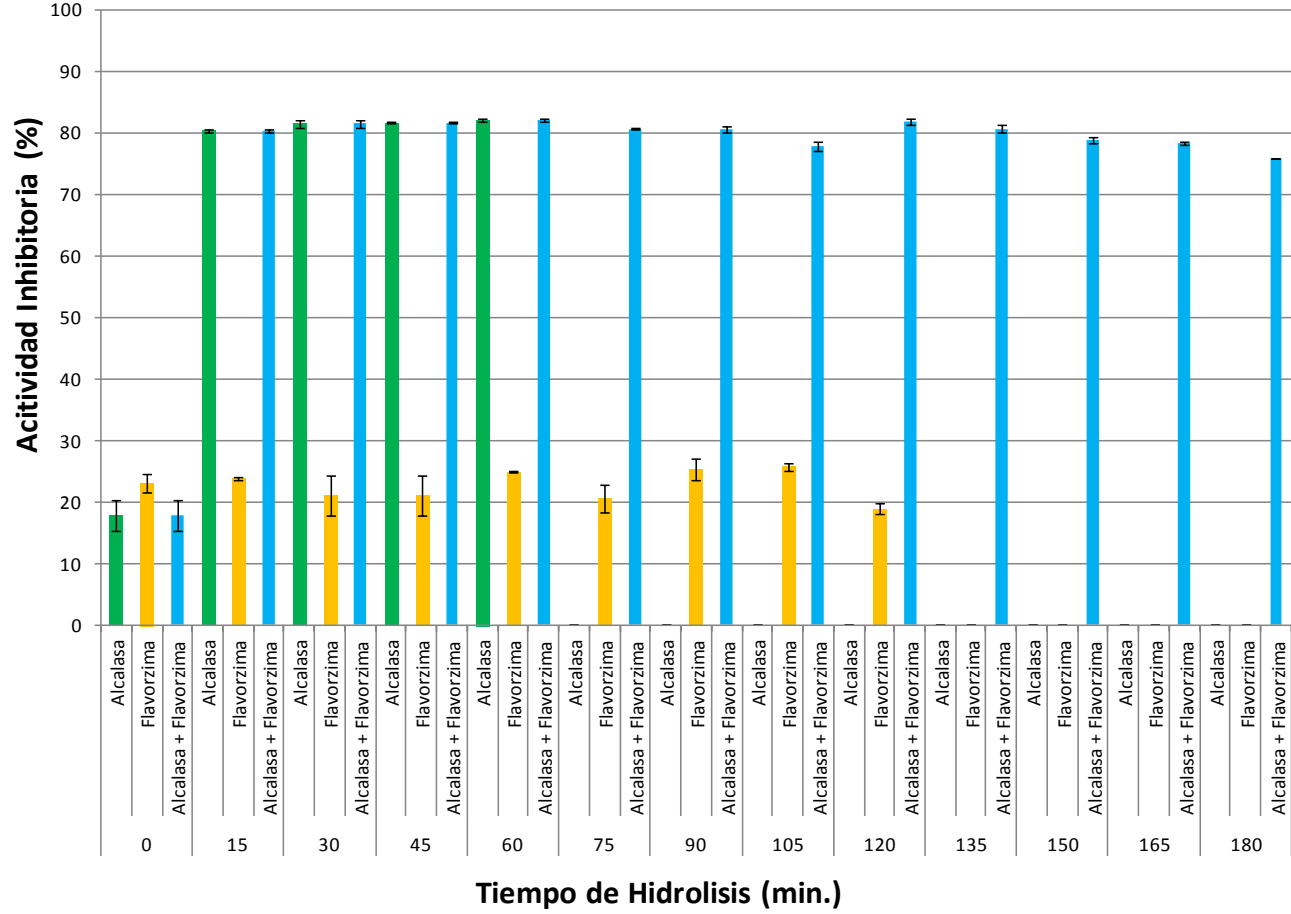
El método se basa en el empleo del tripeptido fluorescente inmovilizado intramolecularmente *o*-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-*L*-phenylalanyl-*L*-proline (Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro). La hidrólisis de este sustrato por la acción de ECA genera el producto fluorescente *o*-aminobenzoilglicina (Abz-Gly), que puede cuantificarse fácilmente fluorimétricamente usando longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas. Entre las ventajas que presenta el empleo de este método se pueden mencionar las siguientes: a) implica solo un reactivo, evitando la derivatización adicional, extracción con disolventes orgánicos o separaciones cromatográficas de los productos de reacción; b) la detección por fluorescencia de los productos de reacción da como resultado una alta sensibilidad y precisión; c) además del hecho de que todos los reactivos se encuentran comercialmente disponibles (**Sentandreu y Toldrá, 2006**).

La evaluación de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina se llevó a cabo según el método descrito por **Sentandreu y Toldrá (2006)**. Como control positivo se utilizó ECA de pulmón de conejo (A-6778 Sigma) a una concentración de una unidad/mL. Se evaluaron los hidrolizados proteicos a una concentración de 1 mg Prot/mL obtenidos a distintos tiempos empleando hidrólisis extensiva con Alcalasa y Flavorzima, así como su hidrólisis secuencial, de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

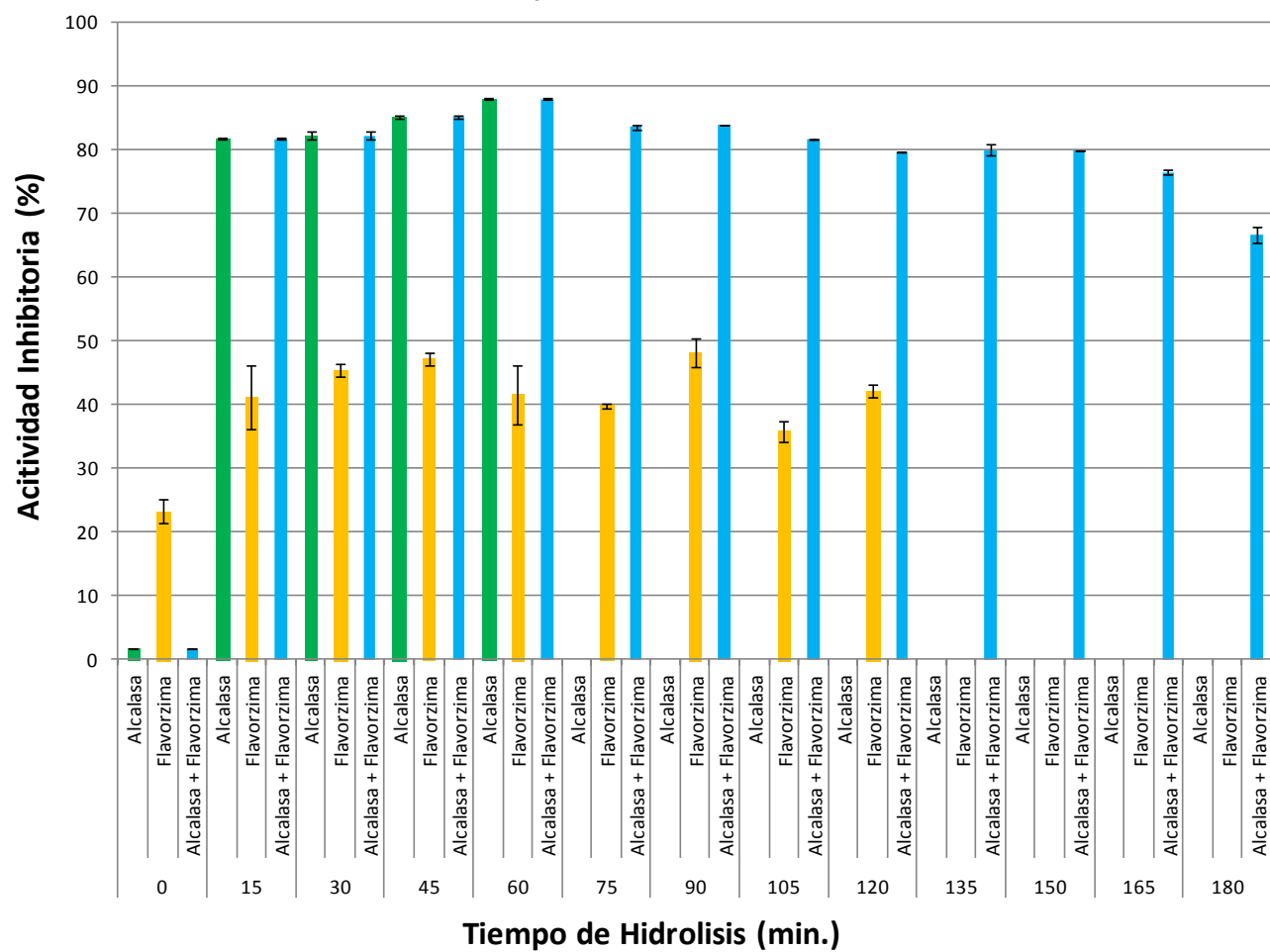
La actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. se muestra en las Figuras 43, 44 y 45, respectivamente.

En las Figuras 43-45, puede observarse claramente la influencia que ejerce el tipo de enzima empleada durante la hidrólisis sobre la capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina. Caso contrario a lo descrito en la actividad antioxidante, los valores más elevados son los mostrados en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa, los cuales rondan el 80-90% en las tres especies, mientras que los valores más deficientes son los mostrados con Flavorzima, oscilando entre el 40-50%, con excepción de los hidrolizados de *A. hypochondriacus* L., los cuales presentan una pobre actividad antihipertensiva alcanzando únicamente hasta 25%.

Estos resultados difieren a lo descrito en *A. hypochondriacus* L. por **Soriano-Santos y Escalona-Buendia (2015)**, quienes bajo condiciones similares de hidrólisis empleando Alcalasa reportaron valores entre un 18-20% de capacidad inhibitoria en hidrolizados de la fracción albumina y globulina, mientras que al aumentar el tiempo de hidrólisis y la relación enzima sustrato observaron porcentajes que alcanzaban el 80% de inhibición.



**Figura 43.** Actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* L.



**Figura 44.** Actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados proteicos de *C. quinoa* Willd.

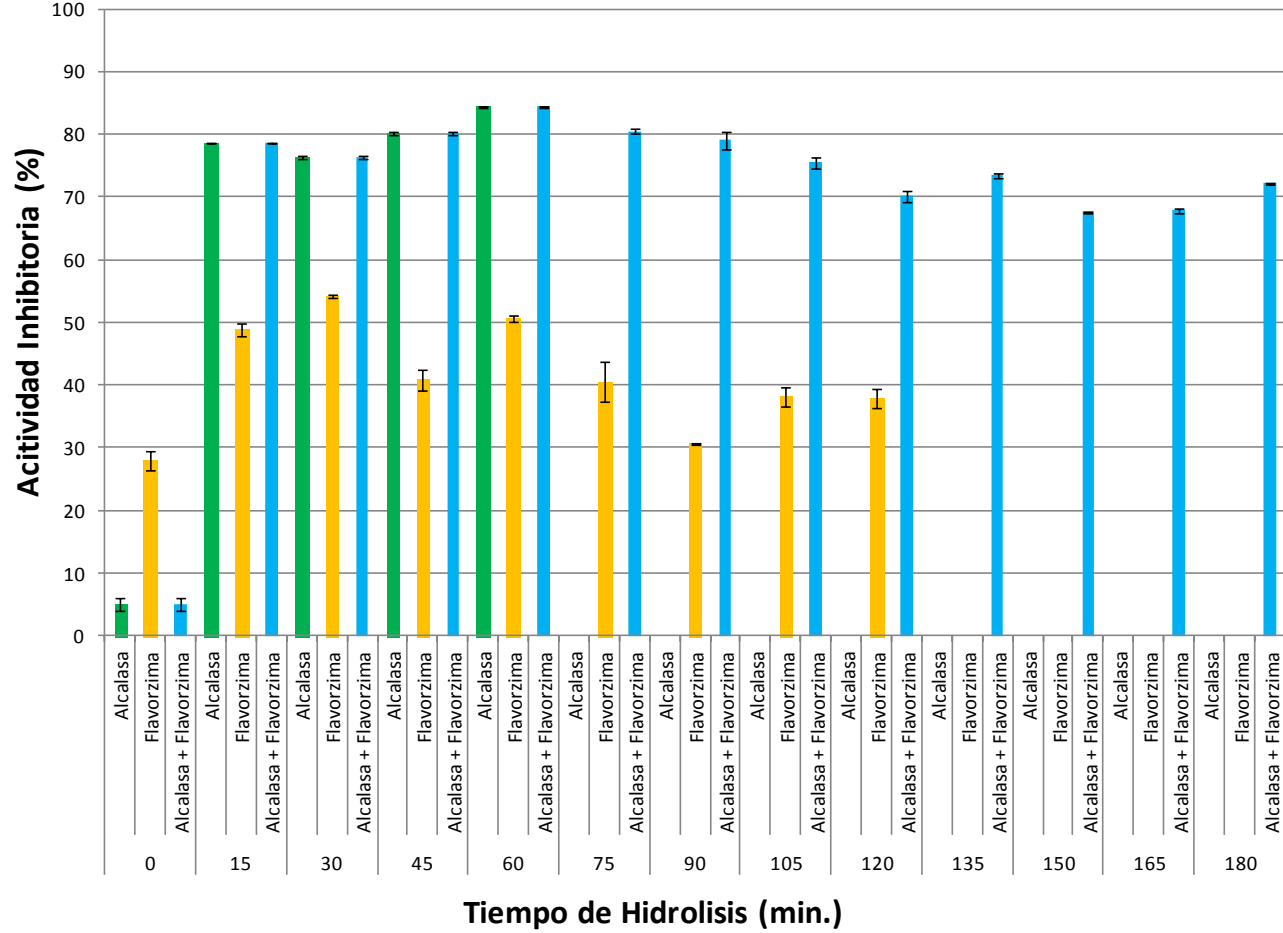


Figura 45. Actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L.

En comparación a lo descrito por **Tovar-Perez et al. (2009)**, quienes observaron que al añadir la Alcalasa, la actividad inhibidora de ECA aumenta gradualmente a medida que la hidrólisis prosigue (alcanzando valores de hasta un 40%), los porcentajes inhibitorios conseguidos son muy superiores, además de que el tiempo de hidrólisis es mucho menor respecto al de estos investigadores, dado que emplearon cerca de 18 horas para conseguir esta actividad inhibitoria.

Con respecto a la actividad inhibitoria de *C. quinoa* Willd., los resultados son muy similares a los descritos por **Aluko y Monu (2003)**, quienes observaron que la reducción del tamaño del péptido aumenta significativamente la capacidad del hidrolizado para inhibir la actividad de la ECA, reportando valores que van de un 15 a un 10% de actividad residual empleando alcalasa, por lo que la ultrafiltración podría ser sin duda una alternativa potencial para la obtención de péptidos con mayor actividad antihipertensiva. Esto es apoyado por un trabajo previo en que se mostró que los péptidos de mayor tamaño (aproximadamente de 10 aminoácidos) no tenían efecto inhibitorio sobre la ECA (**Oshima et al., 1979**).

**Segura-Campos et al. (2013)**, evaluaron la capacidad inhibitoria de hidrolizados de *S. hispanica* L. empleando una hidrólisis secuencial Alcalasa-Flavorzima y obtuvieron valores inferiores a los descritos en este ensayo. Observaron que en las distintas fracciones empleadas la capacidad inhibitoria disminuía conforme aumentaba el peso molecular de los péptidos, donde los menores a 1 kDa presentaron 69.3% de inhibición, mientras que los mayores a 10 kDa alcanzaban un 53.8%. Esto evidencia nuevamente el hecho de que los péptidos de bajo peso molecular presentan mayor capacidad inhibitoria de la ECA respecto a las proteínas intactas, lo que resalta la importancia del empleo de proteasas en los ensayos de actividad biológica.



A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 48):

**Tabla 48. Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Amaranto obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.4364 ± 0.00015	a	p<0.01
	15	1.1121 ± 0.00015	b	
	30	1.1254 ± 0.00013	c	
	45	1.1268 ± 0.00039	d	
	60	1.1344 ± 0.00027	e	
<b>Flavorzima</b>	0	0.5013 ± 0.00018	d	p<0.01
	15	0.5102 ± 0.00018	e	
	30	0.4778 ± 0.00028	c	
	45	0.4783 ± 0.00067	c	
	60	0.5228 ± 0.00018	f	
	75	0.4719 ± 0.00014	b	
	90	0.5272 ± 0.00034	g	
	105	0.5314 ± 0.00052	h	
	120	0.4495 ± 0.00101	a	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.4367 ± 0.00069	a	p<0.01
	15	1.1125 ± 0.00048	f	
	30	1.1255 ± 0.00022	g	
	45	1.1266 ± 0.00064	g	
	60	1.1348 ± 0.00020	i	
	75	1.1149 ± 0.00033	f	
	90	1.1142 ± 0.00081	f	
	105	1.0809 ± 0.00025	c	
	120	1.1291 ± 0.00045	h	
	135	1.1151 ± 0.00048	f	
	150	1.0904 ± 0.00053	e	
165	1.0860 ± 0.00092	d		
180	1.0559 ± 0.00076	b		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la inhibición de la ECA.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 49):

<b>Tabla 49. Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Quínoa obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos</b>				
Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.1298 ± 0.00060	a	p<0.01
	15	1.1294 ± 0.00020	b	
	30	1.1357 ± 0.00053	c	
	45	1.1755 ± 0.00028	d	
	60	1.2161 ± 0.00046	e	
<b>Flavorzima</b>	0	0.5036 ± 0.00024	a	p<0.01
	15	0.6964 ± 0.00041	d	
	30	0.7398 ± 0.00041	g	
	45	0.7575 ± 0.00025	h	
	60	0.7002 ± 0.00030	e	
	75	0.6832 ± 0.00026	c	
	90	0.7667 ± 0.00044	i	
	105	0.6413 ± 0.00022	b	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.1298 ± 0.00060	a	p<0.01
	15	1.1294 ± 0.00020	f	
	30	1.1357 ± 0.00053	g	
	45	1.1755 ± 0.00028	g	
	60	1.2161 ± 0.00046	i	
	75	1.1528 ± 0.00036	f	
	90	1.1580 ± 0.00034	f	
	105	1.1277 ± 0.00039	c	
	120	1.1027 ± 0.00012	h	
	135	1.1067 ± 0.00063	f	
	150	1.1063 ± 0.00026	e	
	165	1.0647 ± 0.00038	d	
180	0.9548 ± 0.00038	b		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la inhibición de la ECA.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de chía obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos (Tabla 50):

**Tabla 50. Estadística descriptiva y ANOVA de la inhibición de la ECA empleando hidrolizados proteicos de Chía obtenidos extensiva y secuencialmente a diferentes tiempos**

Enzima	Tiempo	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Alcalasa</b>	0	0.2269 ± 0.00114	a	p<0.01
	15	1.0916 ± 0.00051	c	
	30	1.0586 ± 0.00654	b	
	45	1.1108 ± 0.00025	d	
	60	1.1639 ± 0.00057	e	
<b>Flavorzima</b>	0	0.5577 ± 0.00034	a	p<0.01
	15	0.7744 ± 0.00023	g	
	30	0.8268 ± 0.00036	i	
	45	0.6930 ± 0.00020	f	
	60	0.7914 ± 0.00031	h	
	75	0.6897 ± 0.00021	e	
	90	0.5865 ± 0.00023	b	
	105	0.6649 ± 0.00037	d	
<b>Alcalasa + Flavorzima</b>	0	0.2269 ± 0.00114	a	p<0.01
	15	1.0916 ± 0.00051	h	
	30	1.0586 ± 0.00654	g	
	45	1.1108 ± 0.00025	j	
	60	1.1639 ± 0.00057	k	
	75	1.1142 ± 0.00026	j	
	90	1.0960 ± 0.00062	i	
	105	1.0529 ± 0.00007	f	
	120	0.9930 ± 0.00028	c	
	135	1.0300 ± 0.00017	e	
	150	0.9661 ± 0.00034	b	
	165	0.9677 ± 0.00028	b	
180	1.0156 ± 0.00036	d		

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La acción de la Alcalasa, la Flavorzima y la Alcalasa + Flavorzima difieren en forma altamente significativa (p<0.01) debido a los diferentes tiempos de hidrólisis en la inhibición de la ECA.

De forma general, el hidrolizado que mostró mayor actividad inhibitoria de ECA fue el obtenido a los 60 minutos de hidrólisis con Alcalasa en *C. quinoa* Willd. con un 87.94% (GH=31.22%), seguido de *S. hispanica* L. con 84.37% (GH=18.89%) y *A. hypochondriacus* L. con un 82.15% (GH=26.59%). En comparación con otras proteínas alimentarias, por ejemplo el garbanzo (ECA= 40%; GH=30%, a los 30 minutos; **Pedroche et al., 2002**) y el frijol mungo (ECA= 80%; GH=16%, a los 120 minutos; **Li et al., 2005**) los valores obtenidos son superiores. Sin embargo, a pesar de que los péptidos evaluados proceden de un proceso de hidrólisis extensiva, se observa que un grado de hidrólisis más elevado no siempre está relacionado con una mayor inhibición de la ECA.

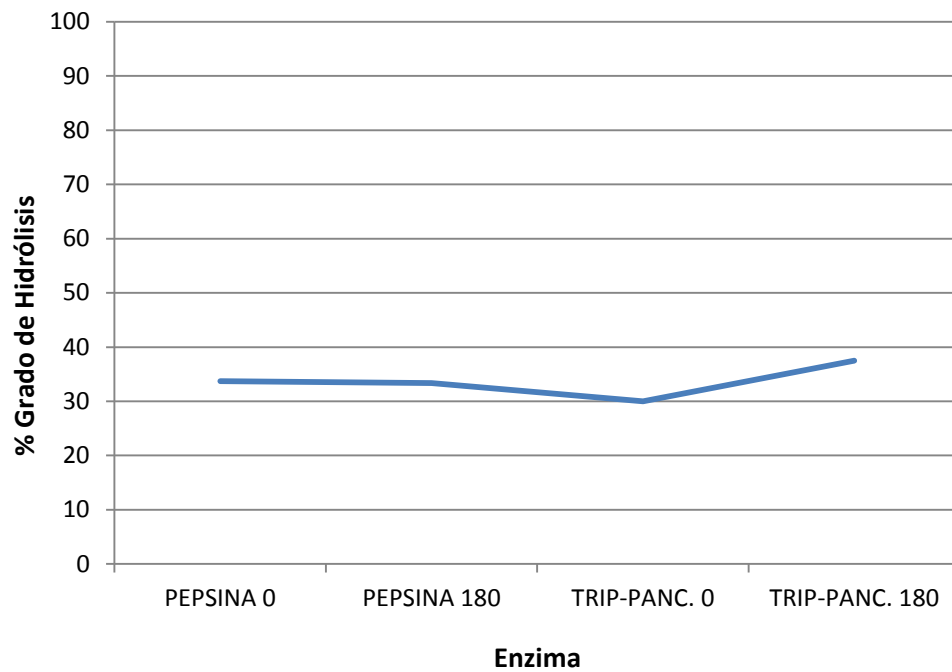
**Matsufuji et al. (1994)** describieron que a partir de la hidrólisis de proteínas contenidas en el músculo de sardina empleando Alcalasa, los péptidos con capacidad inhibitoria de la ECA eran resistentes a la hidrólisis gastrointestinal, debido principalmente a la reducción en el tamaño de los péptidos. Por consiguiente, esto sugiere que los péptidos con bajo peso molecular podrían ser absorbidos fácilmente por el cuerpo y ser capaces de ejercer funciones fisiológicas tales como la inhibición de la actividad de la ECA y la eliminación de radicales libres, lo cual resulta en un efecto prometedor que ayude a contrarrestar problemas de salud.

### 7.5.3. Simulación gastrointestinal *in vitro* de los péptidos obtenidos de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L.

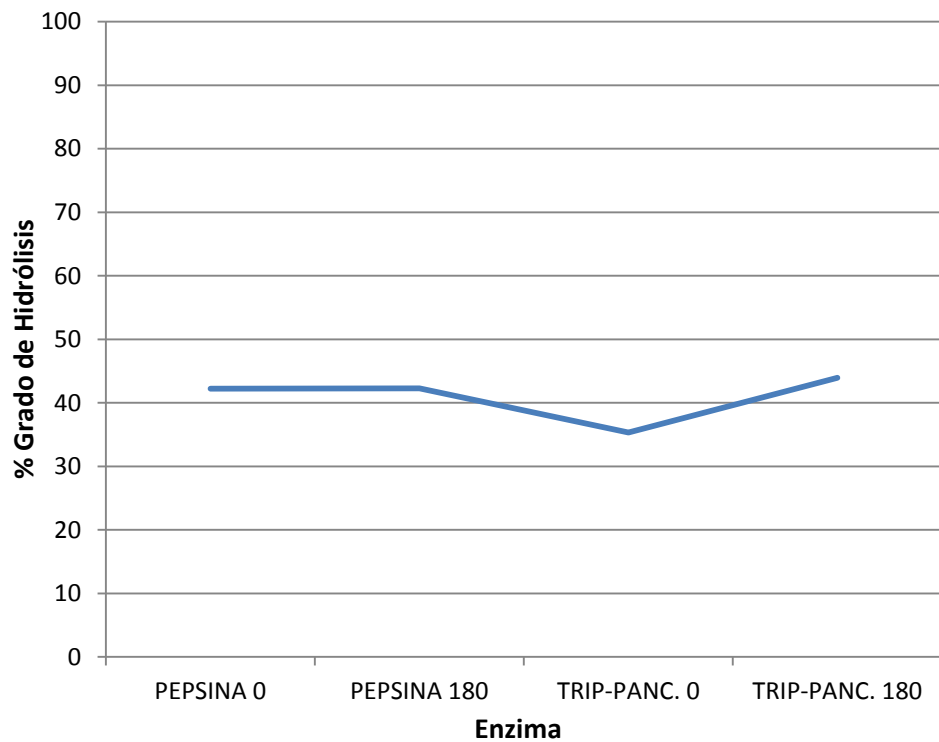
Los alimentos proporcionan una fuente rica de péptidos bioactivos, los cuales pueden influir positivamente en la salud (**Kitts y Weiler, 2003**). Estos péptidos se encuentran codificados en las proteínas y pueden liberarse *in vitro* durante el procesamiento de los alimentos o *in vivo* después de la digestión gastrointestinal. Los péptidos bioactivos pueden ejercer sus efectos sobre el sistema gastrointestinal o ser absorbidos a través del tracto intestinal y actuar sobre sistemas importantes. En los últimos años, diversos investigadores han intentado identificar los componentes alimentarios con beneficios potencialmente terapéuticos (**Hernández-Ledesma et al., 2014**), en particular los péptidos bioactivos como componentes fisiológicamente activos (**Korhonen y Pihlanto, 2006**).

Por esta razón, resultó importante evaluar el comportamiento del hidrolizado a través de una simulación gastrointestinal *in vitro*, mediante la cual puede observarse el efecto del pH y de las enzimas digestivas sobre los péptidos bioactivos empleados.

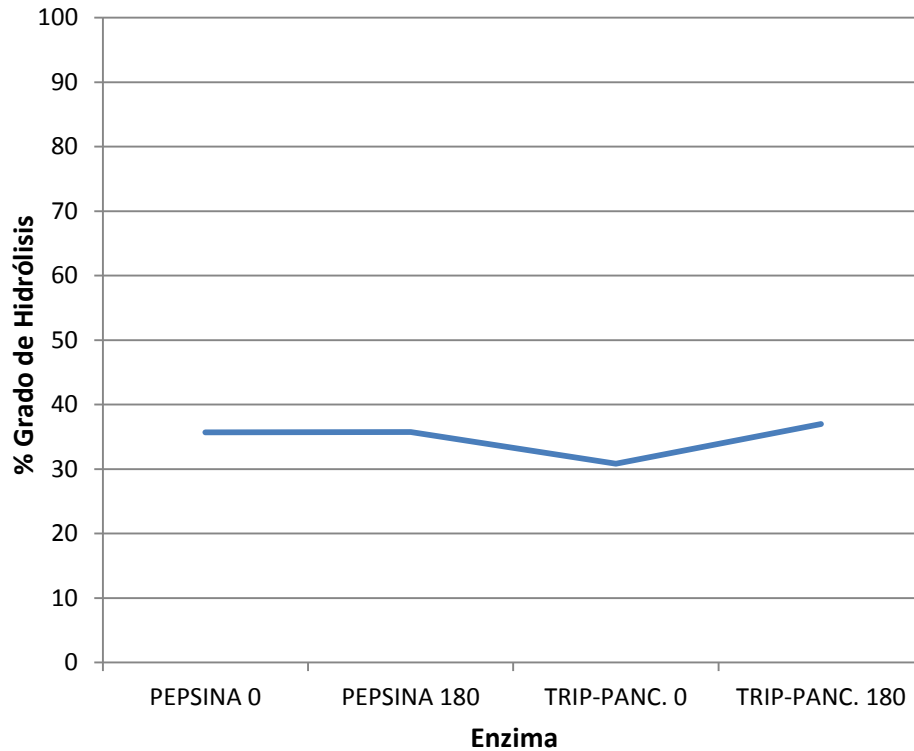
La simulación gastrointestinal de los hidrolizados proteicos obtenidos con Alcalasa durante 60 minutos de hidrólisis de *A. hypochondriacus* L, de *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. se muestra en las Figuras 46, 47 y 48.



**Figura 46.** Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de *A. hypochondriacus* L.



**Figura 47.** Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de *C. quinoa* Willd.



**Figura 48.** Simulación gastrointestinal del hidrolizado proteico de *S. hispanica* L.

En las Figuras 46-48, puede observarse el comportamiento de los péptidos de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. bajo el tratamiento con enzimas digestivas, pepsina y tripsina-pancreatina. El porcentaje más bajo de hidrólisis se observa en *S. hispanica* L. (GH=36.99%), seguido de *A. hypochondriacus* L. (GH=37.48%) y *C. quinoa* Willd. (GH=43.94%).

Estos resultados son bastante similares a los descritos por **Orsini et al. (2011)**, quienes evaluaron el efecto de diferentes condiciones de simulación gastrointestinal sobre el grado de hidrólisis en proteínas de *Amaranthus mantegazzianus* L., obteniendo valores próximos al 42.0%. De acuerdo con estos resultados, la acción de las enzimas gastrointestinales se redujo cuando se realizó una hidrólisis previa con alcalasa,

presentando un porcentaje de hidrólisis de 29.2%, el cual, como ya se ha mencionado en apartados previos, es bastante parecido al obtenido en *A. hypochondriacus* L. (26.59%) y *C. quinoa* Willd. (31.22%), pero superior al de *S. hispanica* L. (18.89%). Ellos observaron que un aumento en las relaciones pepsina/proteína y pancreatina/proteína producía un aumento significativo en el grado de hidrólisis. Sin embargo, un aumento en el tiempo de reacción (de 60 a 90 minutos para la pepsina y de 30 a 60 minutos para la pancreatina) no afectaba a este parámetro.

La pancreatina, en particular, mostró una actividad muy limitada sobre este sustrato, siendo una posible explicación el hecho de que la Alcalasa, similar a varias proteasas digestivas, es una serina proteasa, pero con una amplia gama de especificidad (**Chabanon et al., 2007**). De este modo, la Alcalasa podría escindir algunos sitios que constituyen objetivos específicos para la acción de la pancreatina.



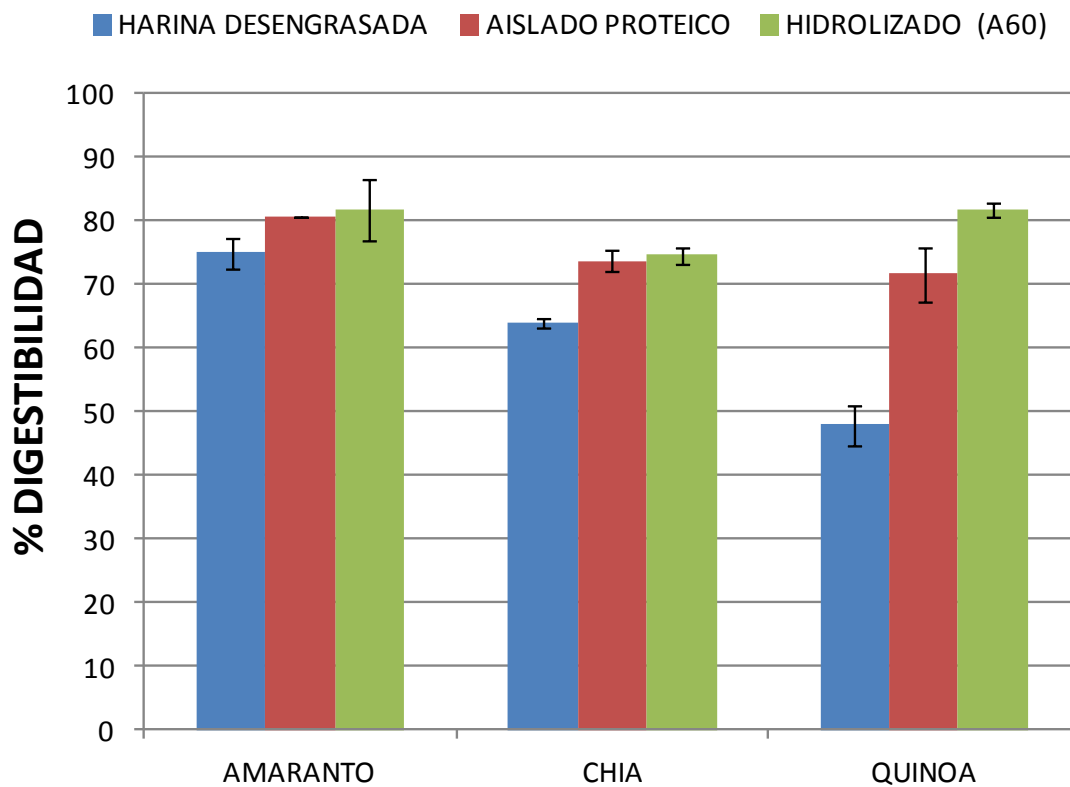
#### 7.5.4. Digestibilidad *in vitro* de las proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chenopodium quinoa* Willd. y *Salvia hispanica* L. tras su incubación con proteasas digestivas

Previamente, se ha hablado sobre el contenido aminoacídico que presentan las proteínas de las especies en estudio, pero una de las propiedades más importantes de una proteína comestible es que debe tener una buena digestibilidad (FAO/WHO, 1991). De acuerdo con Monroy-Torres *et al.* (2008), la digestibilidad de las proteínas *in vivo* puede clasificarse de la siguiente manera: a) alta (93-100%), representada por proteínas de origen animal (carne, pescado, leche, huevo) y algunas de origen vegetal (harina de trigo baja en fibra, aislado proteico de soya); b) intermedia (86-92%), tales como harinas integrales (maíz, soya, trigo, avena); y c) baja (70-85%), donde se encuentran cereales procesados para consumo directo (maíz, trigo, avena, etc.). Por tanto, la digestibilidad es un parámetro determinante en la calidad de una proteína, mejorando con ello su valor biológico, donde una buena digestibilidad podría significar que una proteína es absorbida y finalmente empleada por el organismo.

Partiendo de esto, la hidrólisis enzimática de las proteínas puede ser una forma de mejorar su valor biológico y propiedades funcionales, la cual ya ha sido utilizada en la industria alimentaria (Nielsen y Olsen, 2002; Clemente, 2000; Adler-Nissen, 1986). Algunas de las aplicaciones más conocidas de las proteasas en la industria alimentaria han tenido la finalidad de modificar estructuras proteicas, mejorar la solubilización de concentrados de proteínas de pescado, reblandecer la carne, hidrolizar la caseína de la

leche y cambiar la textura de quesos, mejorando con ello la calidad y el valor nutricional de los productos finales (Nielsen y Olsen, 2002; Godfrey, 1996; Pearce, 1995).

La digestibilidad de la harina, del aislado y del hidrolizado proteico de *A. hypochondriacus* L, de *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L. se muestra en la Figura 49.



**Figura 49.** Porcentaje de digestibilidad de la harina, aislado e hidrolizado proteico de *A. hypochondriacus* L., *C. quinoa* Willd. y *S. hispanica* L.

A continuación se presenta la estadística descriptiva y ANOVA de la digestibilidad *in vitro* por materia prima y por especie de amaranto, quínoa y chíá (Tabla 51 y 52):

**Tabla 51. Estadística descriptiva y ANOVA de la digestibilidad de la harina, aislado e hidrolizado proteico de Amaranto, Quínoa y Chía**

Materia prima	Especie	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Harina</b>	Amaranto	1.0480 ± 0.19420	c	p<0.01
	Quínoa	0.7642 ± 0.02283	a	
	Chía	0.9281 ± 0.12434	b	
<b>Aislado</b>	Amaranto	1.1154 ± 0.00146	b	p<0.01
	Quínoa	1.0100 ± 0.03367	a	
	Chía	1.0332 ± 0.1444	a	
<b>Hidrolizado</b>	Amaranto	1.1299 ± 0.04461	b	p<0.05
	Quínoa	1.1296 ± 0.01075	b	
	Chía	1.0422 ± 0.01016	a	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La digestibilidad de las harinas y los aislados proteicos difieren en forma altamente significativa (p<0.01), mientras que los hidrolizados proteicos difieren en forma significativa (p<0.05) debido a las diferentes especies analizadas.

**Tabla 52. Estadística descriptiva y ANOVA de la digestibilidad por especie de la harina, aislado e hidrolizado proteico de Amaranto, Quínoa y Chía**

Especie	Materia prima	$\bar{X} \pm DE$	Tukey	Valor P
<b>Amaranto</b>	Harina	1.0480 ± 0.19420	a	p<0.05
	Aislado	1.1154 ± 0.00146	b	
	Hidrolizado	1.1299 ± 0.04461	b	
<b>Quínoa</b>	Harina	0.7642 ± 0.02283	a	p<0.01
	Aislado	1.0100 ± 0.03367	b	
	Hidrolizado	1.1296 ± 0.01075	c	
<b>Chía</b>	Harina	0.9281 ± 0.00495	a	p<0.01
	Aislado	1.0332 ± 0.01444	b	
	Hidrolizado	1.0422 ± 0.01016	b	

Letras diferentes marcan diferencia significativa (p<0.05)

La digestibilidad de las distintas materias primas empleadas de quínoa y chía difieren en forma altamente significativa (p<0.01), mientras que las distintas materias empleadas de Amaranto difieren en forma significativa (p<0.05) debido a su naturaleza proteica.

La digestibilidad es uno de los aspectos más importantes que deben evaluarse para la elaboración de alimentos biofuncionales. En la Figura 49, puede observarse que el valor más bajo de digestibilidad se presenta en la harina desengrasada, lo cual se encuentra en concordancia a lo exhibido con la deficiente solubilidad proteica previamente descrita. En lo que respecta a los aislados proteicos, los valores son superiores a la harina desengrasada, pero aun no representan una notable mejoría en su porcentaje, lo cual puede estar relacionado a que ha ocurrido una desnaturalización parcial de las proteínas durante el proceso de obtención del mismo. Con respecto a los hidrolizados proteicos, a pesar de presentar los valores más altos de digestibilidad (entre el 70-80%), no se observa una notable mejoría respecto a los aislados proteicos. Es por ello que una buena digestibilidad y absorción intestinal de los hidrolizados extensivos obtenidos es algo deseable, ya que pueden ser empleados en pacientes que presenten alguna actividad gastrointestinal deficiente.

## 8. CONCLUSIONES

La obtención de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática a partir de las harinas desengrasadas de amaranto, quínoa y chía, resulta ser una alternativa interesante para el aprovechamiento no solo de estos, sino también de una amplia gama de residuos agroindustriales producidos lo cual ayudara en gran medida a la preservación de la calidad del medio ambiente, y de igual forma permitirá orientar la implementación de nuevas tecnologías hacia una transformación sustentable de los recursos naturales.

Los hidrolizados proteicos obtenidos del aislado de chía han resultado con mayor actividad antioxidante que los de amaranto y quínoa.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) ha presentado mayor grado de inhibición con los hidrolizados obtenidos empleando endoproteasa (Alcalasa).

Los péptidos obtenidos por hidrólisis extensiva con Alcalasa durante 60 minutos de amaranto, quínoa y chía han mostrado mayor porcentaje de solubilidad y digestibilidad que las harinas y aislados proteicos correspondientes.

La elaboración de un alimento funcional (sustituto alimentario) a partir de hidrolizados proteicos puede ser una alternativa agroalimentaria de interés por las características bioactivas y tecnofuncionales potenciales en el mismo.

## 9. PERSPECTIVAS

En una sociedad donde en la actualidad la generación de desechos por parte de las industrias va en aumento, ya sea por satisfacer las necesidades humanas que resultan volverse cada vez mas demandantes, o bien, por que no se ha implementado algun programa que busque la optimización de los recursos subutilizados, el aprovechamiento de toda clase de residuos agroindustriales resulta clave para fomentar la preservación del medio ambiente, así como alentar a las futuras generaciones a la búsqueda de alternativas que permitan el desarrollo sustentable de los recursos naturales. Respecto a los péptidos bioactivos, resulta interesante el empleo potencial de ellos para el tratamiento de enfermedades crónicas en humanos así como en la elaboración de suplementos proteicos para deportistas o dietas especializadas para personas de la tercera edad, por lo que la investigación a futuro debe de ir encaminada a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales que puedan ser objeto de estudio para la obtención de nuevos compuestos bioactivos, y que a su vez puedan ser empleados en la elaboración de alimentos funcionales como sustitutos alimentarios con funcionalidad específica.

Es por ello que la obtención de péptidos bioactivos viá hidrólisis enzimática a partir de las harinas desengrasadas de amaranto, quinoa y chíá, resulta ser una alternativa interesante para el aprovechamiento no solo de estos, sino también de una amplia gama de residuos agroindustriales producidos, lo cual ayudará en gran medida a la preservación de la calidad del medio ambiente, y de igual forma permitirá orientar la implementación de nuevas tecnologías hacían una transformación sustentable de los recursos naturales.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L., Romero, N., Tapia, C., Silva, J. y Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates. J. Agric. Food Chem. 56, 4745-4750. <http://dx.doi.org/10.1021/jf703689u>.
- Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R. y Carrillo, W. (2016). Identification of protein isolate from Amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 M solvents. Asian J. Pharm. Clin. Res. Vol. 9, Issue 3. 331-334
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27, 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science. 427 p.
- Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M. y Tanoguchi, T. (1991). Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipatic  $\alpha$ -helical model peptides of various chain lengths. J. Biol. Chem. 296: 20218-20222.
- Agrodata y CEPES. (1997). El Niño de 1983. Efectos Económicos del Fenómeno del Niño. CEPES.
- Aguilera G. Y. (2009). Harinas Leguminosas deshidratadas: Caracterización Nutricional y valoración de sus propiedades tecno-funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid facultad de Ciencias Departamento de Química Agrícola. p. 213-281.
- Ahmed, T., Singhal, R., Kulkarni, P. y Pal, M. (1998). A lesser-know grain, *Chenopodium quinoa*: review of the chemical composition of its edible parts. Food and Nutrition Bulletin. Vol. 19. No. 1. The United Nations University.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatukul, W. y Rao, R. M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. J. Agric. Food Chem. 47, 1340-1345.

- Akubugwo, I. E., Obasi, N. A., Chinyere, G. C. y Ugbogu, A. E. (2007). Nutritional and chemical value of *Amaranthus hybridus* L. leaves from Afikpo, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (24), pp. 2833-2839
- Alaiz, M., Navarro, J.L., Girón, J. y Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by highperformance chromatography alters derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *J Chromatogr A* **591**, 181-186. DOI: 10.1016/0021-9673(92)80236-N
- Ali, N. M., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beli, B. K., Tan, S. W. y Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Article ID: 171956.
- Aller, R., Antonio de Luis, D., Izaola, O., La Calle, F., Del Olmo, L. y Fernández, L. (2004). Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose level in healthy subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 65: 7-11.
- Alonso-Calderón, A., Chavez-Bravo, E., Rivera, A., Montalvo-Paquini, C., Arroyo-Tapia, R. y Monterrosas-Santamaria, M. (2013). Characterization of black chia seed (*Salvia hispanica* L.) and oil quantification of  $\beta$ -sitosterol. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2(1): 70-72.
- Aluko, R. E. y Monu, E. (2003). Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*. Vol. 68, Nr. 4, 1254-1258.
- Alvarado, D. (2011). Caracterización de la semilla del Chan (*Salvia hispanica* L.) y diseño de un producto funcional que la contiene como ingrediente. *Revista 23 de la Universidad de Guatemala*. 43-49.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S. y Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*. 18. 1125-1137.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22(1): 79-89.
- Apostolatos, G. (1984). Protein isolate rich in methionine from the edible dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Technol.* 19, 233-237.



- Aroni, J. C. (2005). Fascículo 3 – Siembra del cultivo de quínoa. In: PROINPA y FAUTAPO (eds.). Serie de Módulos Publicados en Sistemas de Producción Sostenible en el cultivo de la Quínoa: Módulo 2. Manejo agronómico de la Quínoa Orgánica. Fundación PROINPA, Fundación AUTAPO, Embajada Real de los Países Bajos. La Paz, Bolivia. Octubre de 2005. Pp. 45-52.
- Asakura, K., Kojima, T. y Shirasaki, K. (1990). Evaluation of the effects of antigen specific immunotherapy on chronic sinusitis in children with allergy. *Auris Nasus Larynx*. 17: 33-38.
- Astawan, M., Wahyuni, M., Yasuhara, T., Yamada, K., Tadokoro, T. y Maekawa, A. (1995). Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 425-429.
- Ayala, G., Escobedo, L, Cortés, E. y Espitia, R. (2012). El cultivo de amaranto en México, descripción de la cadena, implicaciones y retos. En: *Amaranto: Ciencia y Tecnología*. Capítulo XXII. 315-330.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*. 44: 131-135.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2006). El renacimiento de la chia (Cap. 4, pp. 91-114). En: *Chía, redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas*. 1ra. Ed. Buenos Aires, Argentina: Del Nuevo Extremo. 205 p.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72:1079-1081.
- Ayerza, R. (2010). Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(10):1161-1165.
- Ayerza, R. (2011). The seed's oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) var. Iztac 1, grown under six tropical ecosystems conditions. *Interciencia*. Vol. 36. No. 8. 620-624.

- Ayerza, R. y Coates, W. (2001). The omega-3 enriched eggs: The influence of dietary linolenic fatty acid source combination on egg production and composition. *Canadian Journal of Animal Science*. 81: 355-362.
- Ayerza, R. y Coates, W. (1999). An omega-3 fatty acid enriched chia diet: its influence on egg fatty acid composition, cholesterol and oil content. *Canadian Journal of Animal Science*. 79:53-58.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*. 34: 1366-1371.
- Badui, S. (2006). "Química de los Alimentos" Cuarta edición. Pearson Educación, Mexico, 2006.
- Baer, D. J., Rumpler, W. V., Miles, C. W. y Fahey, G. C. (1997). Dietary fiber decreases the metabolizable energy content and nutrient digestibility of mixed diets fed to humans. *J. Nutr.* 127, 579-586.
- Bale, J. R. y Kauffman, C. S. (1992). Special issue on grain amaranth: New potential for and old crop. *Food Rev. Int.* 8: 1-190.
- Barba de la Rosa, A. P., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martinez, L., Silva-Sanchez, C., Mendoza-Herrera, A., Gonzalez-Castañeda, J. y De León-Rodriguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*. 49: 117-121.
- Barba de la Rosa, A. P., Herrera-Estrella, A., Utsumi, S. y Paredes-López, O. (1996). Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology*. 149: 527-532.
- Barba de la Rosa, A. P., Paredes-López, O. y Gueguen, J. (1992). Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 937-940.
- Barros, C. y Buenrostro, M. (1997). Amarantho. Fuente maravillosa de sabor y salud. México, Grijalbo, 158.

- Becker, R. (1994). Amaranth oil: Composition, processing and nutritional qualities. In: Paredes-López, O. (ed.), Amaranth Biology, Chemistry and Technology. CRC Press, Boca Raton, FL. 133-141.
- Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Betschart, A. A. y Saunders, R. M. (1981). A compositional study of Amaranth grain. J. Food Sci. 46: 1175-1180.
- Bell, J. M. (1993). Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. Can. J. Anim. Sci. 73: 679-697.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. y Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta. 1121: 130-136.
- Beltrán-Orozco, C. y Romero, M. (2003). La chía, alimento milenario. Revista industria alimentaria. 1-26.
- Beltran-Orozco, M., Salgado, M. y Cedillo, D. (2005). Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de Chía (*Salvia hispanica* L.) y de la fibra dietaria obtenida de la misma. Revista Salud Pública y Nutrición. 13: 1-6.
- Benavides, A., Hernández, R., Ramirez, H. y Sandoval, A. (2010). Plantas útiles sin fines alimentarios: plantas utilizadas como especias y sustancias aromáticas (Cap. 3, pp 1-44). En: Tratado de botánica económica moderna. Buena vista, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 332 p.
- Bencini, M. (1986). Functional properties of drumdried chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours. J. Food Sci. 51: 1518-1526.
- Benitez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquim. Clin. Latinoam. 42 (2): 227-236.
- Berghofer, E. y Schoenlechner, R. (2002). Grain Amaranth. In: Belton, P., Taylor, J. (eds), Pseudocereals and less common cereals, grain properties and utilization potencial. Springer-Verlag. 219-260.
- Betschart, A. A., Irving, D. W., Shepherd, A. D. y Saunders, R. M. (1981). Amaranthus cruentus: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components, and the effects of temperature on nutritional quality. J. Food Sci. 46: 1181-1184.

- Beuchat, L. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succynalated peanut flour proteins. *J Agricultural and Food Chemistry* 25: 258-263.
- Blaicher, F. M., Elstner, F., Stein, W. y Mukherjee, K. D. (1983). Rapessed protein isolates: effect of processing on yield and composition of protein. *J. Agric. Food Chem.* 31, 358-362.
- Boatright, W. L. y Hettiarachchy, N. S. (1995). Effect of lipids on soy protein isolate solubility. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1439-1442.
- Bourre, J. (2007). Dietary omega-3 fatty acids for women. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 61: 105-112.
- Bray, T. M. (2000). Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition.* 16: 578-581.
- Breene, W. M. (1991). Food uses of grain amaranth. *Cereal Food World.* 36: 426-429.
- Broekaert, W. F., ariën, W., Terras, F. R. G., De Bolle, M. F. C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M. y Rees, S. B. (1992). Antimicrobial peptides form *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry.* 31: 4308-4314.
- Brouns, F. (1997). Functional foods for athletes. *Trends in Food Sci. & Technol.* 8, 358-363.
- Budin, J. T., Breen, W. M. y Paturn, D. H. (1996), Some Compositional Properties of Seeds and Oils of Eight *Amaranthus* Species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:475-481.
- Burkitt, D.P., Walker, A.R.P. y Painter, N.S. (1974). Dietary fiber and disease. *J Am Med Assoc* **229**(8):1068-1074. DOI: 10.1001/jama.1974.03230460018013.
- Calder, P. (2006). Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition.* 50(2): 54-61.
- Calder, P. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition of pharmacology. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 75(3): 645-662.
- Capitani, M., Spotorno, V., Nolasco, S. y Tomas, M. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *Food Science and Technology.* 45: 94-102.
- Cardenas, M. (1944). Descripción preliminar de las variedades de *Chenopodium quinoa* de Bolivia. *Revista de Agricultura.* Universidad Mayor de San Simón de Cochamba (Bol.). Vol. 2, No. 2, pp. 13-26.

- Casas, A. y Caballero, J. (1995). Domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. *Revista Ciencias*. 40: 36-44.
- Cervantes-Laurean, D., Schramm, D. D., Jacobson, E. L., Halaweish, I., Bruckner, G. G. y Biossonneault, G. A. (2006). Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 17: 531-540.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M. y Perrotin, P. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie*. 80: 155-165.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. y Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*. 42, 1419-1428.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Patthy, A., Sánchez, R. y Pongor, S. (1994). A novel alpha-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 23675-23680.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Agrawal, L., Ghosh, S., Narula, K., Shekhar, S., Naik, P. S., Pande, P. C., Chakraborty, S. K. y Datta, A. (2010). Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene *AmA1* is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 17533-17538.
- Chaplin, L. C. y Andrew, A. T. (1989). Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. *J. Dairy Res.* 56, 544-552.
- Chau, C. F., Cheung, P. C. K. y Wong, Y. S. (1997). Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2500-2503.
- Chau, C. y Cheung, C. (1997). Effect of various processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4773-4776.
- Cheftel, J. C. (1989). "Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas". Acribia S. A., Zaragoza.

- Chen, G., Zhao, L., Zhao, L., Cong, T. y Bao, S. (2007). In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 357-362.
- Chen, H. M., Muramoto, K. y Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 43, 574-578.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. y Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46, 49-53.
- Clare, D. A. y Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.* 83: 1187-1195.
- Clemente, A. (2002). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 11, No.7, p. 254-262.
- Coates, W. (2011). Whole and ground chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, chia oil effects on plasma lipids and fatty acids. (Cap. 37, pp. 309-315). In: Preedy, V., Watson, R. & Patel, V. (Eds.). *Nuts and seeds in health and disease prevention*. Londres, Gran Bretaña: Academic press. 1226 p.
- Cook, J. J., Huang, T. F., Rucinsky, B., Tuma, R. F., Williams, J. A. y Niewiarowski, S. (1988). Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD peptide. *Circulation*. 78: 1248-1253.
- Cordero de los Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A. y Paredes-Lopez, O. (2005). Physicochemical and Functional Characterization of Amaranth (*Amaranth hypochondriacus*) Protein Isolates Obtained by Isoelectric Precipitation and Micellisation. *Food Sci. Tech. Int.* 11(4):269-280.
- Cossio, J. (2005). Fascículo 1 – Preparación del suelo. In: PROINPA y FAUTAPO (eds.). *Serie de Módulos Publicados en Sistemas de Producción Sostenible en el cultivo de la Quínoa: Módulo 2. Manejo agronómico de la Quínoa Orgánica*. Fundación PROINPA, Fundación AUTAPO, Embajada Real de los Países Bajos. La Paz, Bolivia. Octubre de 2005. Pp. 5-28.
- Costea, M. y Tardif, F. J. (2003). The name of the amaranth: histories of meaning. *SIDA*. 20(3): 1073-1083.

- Cruz, J. I., Arana, A. y Urias-Silvas, J. E. (2013). Obtencion de aislados proteicos de la semilla de chia (*Salvia hispanica* L.). Memorias del XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la AMIDIQ.
- Cudic, M. y Otvos, L. J. (2002). Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets*. 3: 101-106.
- Darragh, A. J. (2002). Physiological impact of milk protein.encrypted bioactive peptides. *Bull. Int. Dairy Fed.* 375: 25-31.
- De Bruin, A. (1963). Investigation of the food value of quinoa and cañihua seed. *J. Food Sci.* 29:872-876.
- De Lange, C. F. M., Garbet, V. M., Gillis, D. y Patience, J. F. (1998). Digestible energy contents and apparent ileal amino acids digestibilities in regular or partial mechanically dehulled canola meal samples fed to growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 7, 641-648.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. y Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18.
- Del Castillo, C., Winkel, T., Mahy, G. y Bizoux, J. P. (2007). Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 897-905.
- Dewanto, V., Wu, X. y Hai Liu, R. (2002). Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4959-4964.
- Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H. y Severin, C. (2008). Chía: importante antioxidante vegetal. *Agromensajes*. 56:11-13.
- Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. y Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(3): 249-268.
- Dini, A., Rastrelli, L., Saturnino, P. y Schettino, O. (1992). A compositional study of *Chenopodium quinoa* seeds. *Nahrung*. 36:400-404.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Da Cunha, M. y Alves, E. W. (2006). Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the médium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760: 1323-1332.

- Dizes, J. y Bonifacio, A. (1992). Estudio en microscopia electrónica de la morfología de los órganos de la quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) y de la cañahua (*Chenopodium pallidicaule* A.) en relación con la resistencia a la sequía. In: D. Morales y J. Vacher (eds.). Actas del VII Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos. La Paz, Bolivia. 4-8 de julio de 1991. Pp-69-74.
- Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M. y Kroon, P. A. (2007). Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. In: Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (eds.), *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, London. 303-351.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017
- Dumas, J.B.A. (1831). Procedés de l'analyse organique, *Ann Chim Phys* **247**, 198-213.
- Dziuba, J., Niklewicz, M., Iwaniak, A., Darewicz, M. y Minkiewicz, P. (2005). Structural properties of bioactive animal protein fragments accessible for proteolytic enzymes. *Polimery*. 6: 424-9.
- Easa, A. M., Armstrong, H. J., Mitchell, J. R., Hill, S. E., Harding, S. E. y Taylor, A. J. (1996). Maillard induced complexes of bovine serum albumin - a dilute solution study. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 297-301.
- Elías, R. J., Kellerby, S. S. y Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(5), 430-441.
- Erazo, M., Gromaz, J., Domínguez, K., Carrasco, R., Valls, N. y Libuy, M. (2014). Ácido alfa linolénico y sus efectos en salud: análisis de la evidencia básica, clínica y epidemiológica. Informe Técnico. Facultad de medicina. Universidad de Chile. 160 p.
- FAO. (1997). El cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización. [On-line]. Available from: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro01/Cap1.htm>.  
Accesed: 13 de Septiembre, 2017.
- FAO. (2010). El daño producido por las heladas: fisiología y temperaturas críticas. (Capítulo 4, pp. 73-98). En: *Protección contra las heladas: fundamentos, práctica y economía*. Roma, Italia. 241 p. <http://www.fao.org/docrep/012/y7223s/y7223s05.pdf>



- FAO. (2011). The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- FAO/OMS/UNU. (1985). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1985. 219 p.
- FAO/WHO. (1991). Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food Nutr. Paper 51, FAO, Geneva, 23-24.
- Farnaud, S. y Evans, R. W. (2003). Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40:395-405.
- Feine, L. B., Harwood, R., Kauffman, S. C. y Senft, J. P. (1979). Amaranth: gentle giant of the past and the future. En: G. A. Ritchie (Ed.). *New Agricultural Crops*. AAAS Selected Symposium 38. Westview Press, Boulder, CO. 41-63.
- Fernández-Alonso, J. y Rivera-Díaz, O. (2006). *Las labiadas*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 679 p.
- Flemming, M. C. (1989). Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 249-265.
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.* 44, 631-653.
- Fuentes, F., Martínez, E., Delatorre, J., Hinrichsen, P., Jellen, E. y Maughan, J. (2006). Diversidad genética de germoplasma chileno de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) usando marcadores de microsatélites SSR. In: A. Estrella, M. Batallas, E. Peralta y N. Mazón (eds.). *Resúmenes XII Congreso Internacional de Cultivos Andinos*. 24 al 27 de julio de 2006. Quito, Ecuador.
- Fujita, H., Yokoyama, K., Yasumoto, R. y Yoshikawa, M. (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22 Suppl. 1: S304-305.
- Fukudome, S., Shimatsu, A., Sukanuma, H. y Yohikawa, M. (1995). Effect of gluten exorphins a5 and b5 on the postprandial plasma insulin level in conscious rats. *Life Sci.* 57: 729-734.

- Garandillas, H. (1968). Caracteres botánicos más importantes para la clasificación de la quínoa. In: Universidad Nacional Técnica del Altiplano (ed.). Anales de la Primera convención de Quenopodiáceas quínoa – cañahua. Pruno, Perú. Pp. 41-49.
- Gandarillas, H. (1979). Genética y origen. In: M. Tapia (ed.). Quínoa y Kañiwa, cultivos andinos. Bogota, Colombia. CIID, Oficina Regional para América Latina. Pp. 45-64.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211(1): 139-143.
- García, B., Saldaña, A. y Saldaña, L. (2012). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 12(2): 187-196.
- Gassmann, B. (1983). Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Nahrung.* 27, 351-369.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y. y Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1315-1323.
- George, S., Sivasankar, B., Jayaraman, K. y Vijayalakshmi, M. A. (1997). Production and separation of the methionine rich fraction from chick pea protein hydrolysate generated by proteases of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Process Biochemistry.* 32, 401-404.
- Giusti, K. (1970). El género *Chenopodium* en la Argentina. I. Número de cromosomas. *Darwiniana.* 16. 98-105.
- Godfrey, T. (1996). Protein modification. In: Godfrey, T., West, S. (Eds.). *Industrial enzymology.* 2 ed. Great Britain: Macmillan, Cap. 2.18.
- Gonçalves, N., Vioque, J., Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Bautista, J. y Millán, F. (1997). Obtencion y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y Aceites.* 48, 282-289.
- González, F., Beltrán-Orozco, M. y Vargas, M. (2010). The antioxidant capacity and phenolic content of chia's (*Salvia hispanica* L.) integral seed and oil. *Journal of Biotechnology.* 150: 315.
- Gonzalez, J. A., Roldan, A., Gallardo, M., Escudero, T. y Prado, F. E. (1989). Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from inca crops: *Chenopodium quinoa* (quinoa). *Plant Foods Hum. Nutr.* 39:331-337.

- Gorinstein, S., Lojek, A., Ciz, M., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Medina, O., Moreno, M., Salas, I. y Goshev, I. (2008). Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 629-637.
- Gorinstein, S., Medina-Vargas, O. J., Jaramillo, N. O., Arnao-Salas, I., Martinez-Ayala, A. L., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Katrich, E. y Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology.* 225: 321-328.
- Gorinstein, S. y Moshe, R. (1991). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J. Agric. Food Chem.* 39: 851-854.
- Gottschik, W. (1994). The use of enzymes in food production. *Food Technology Europe.* 2, 158-160.
- Gouda, K. G. M., Gouda, L. R., Rao, A. G. A. y Prakash, V. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine Max*). *J. Agric. Food Chem.* 54: 4568-4573.
- Grobelnik Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M. y Bavec, F. (2009). Nutrition value and use of grain amaranth: potencial future application in bread making. *Agricultura* 6: 43-53.
- Grubben, G. J. H. y Van Sloten, D. H. (1981). Genetic resources of amaranths. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 57.
- Gualberto, D. G., Bergman, C. J., Kazemzadeh, M. y Weber, C. W. (1997). Effect of extrusion processing on the soluble and insoluble fiber, and phytic acid contents of cereal brans. *Plant Foods. Hum. Nutr.* 51: 187-198.
- Gunstone, F. D., Hardwood, J. L. y Dijkstra, A. J. (2007). The lipid handbook. Third edition, CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Gutierrez-Rosati, A. (2004). Información biomorfológica de la “chía” *Salvia hispanica* L. Informe interno, Universidad Nacional Agraria La Molina. (s.n.). 14 p.
- Hanssens, I., van Ceunbroeck, J. C., Pottel, H., Preaux, G. y van Cauwelaert, F. (1985). Influence of the protein conformation on the interaction between alpha-lactalbumin and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 817, 154-164.

- Haque, E. y Chand, R. (2006). Milk protein derived bioactive peptides. [On-line]. Available from <https://www.dairyscience.info/index.php/exploitation-of-anti-microbial-proteins/111-milk-protein-derived-bioactive-peptides.html>. Accessed: 13 September, 2017.
- Heisser, C. B. y Nelson, D. C. (1974). On the origin of the cultivated chenopods (*Chenopodium*). *Genetic*. 78: 503-505.
- Hernández, R. y Herrerías, J. (2004). Evolución de la tecnología hidro-agro-ecológica mesoamericana desde su origen prehistórico. *Alternativas y procesos de Participación Social A.C. Tijuana, México*. 9 p.
- Hernández-Gómez, J., Miranda-Colín, S. y Peña-Lomeli, A. (2008). Cruzamiento natural de chia (*Salvia hispanica* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 4(3): 331-337.
- Hernández-Ledesma, B., Garcia-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., y Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38(2), 82-100.
- Hernández-Ledesma, B., Martín-Álvarez, P. J. y Pueyo, E. (2003). Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: Influence of the inhibition type. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4175-4179.
- Hernández-Ledesma, B., Miralle, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J. Sci. Food Agric.* 85: 1041-1048.
- Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K. y Gnanasambandam, R. (1996). Preparation and functional properties of a protein isolate from deffated wheat germ. *Cereal Chem.* 73, 364-367.
- Heuer, B., Yaniv, Z. y Ravina, I. (2002). Effect of late salinization of chia (*Salvia hispanica*), stock (*Matthiola tricuspidata*) and evening primrose (*Oenothera biennis*) on their oil content and quality. *Industrial Crops and Products*. 15: 163-167.
- Hofmann, T. (1998). Studies on the relation between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* 465, 3891-3895.

- Honig, D. H., Rackis, J. J. y Wolf, W. J. (1987). Effects of pH and salt on yields, trypsin inhibitor content, and mineral levels of soybean protein isolates and wheys. *J. Agric. Food Chem.* 35, 967-971.
- Houston, M. C. (2002). The role of vascular biology, nutrition and nutraceuticals in the prevention and treatment of hypertension. *JANA S 1*, 1-71.
- Hsieh, Y. P. C., Pearson, A. M., Morton, I. D. y Magee, W. T. (1980). Some changes in the constituents upon heating a model meat flavor system. *J. Sci. Food Agric.* 31, 943-949.
- Huang, J. L., Fu, S. T., Jiang, Y. Y., Cao, Y. B., Guo, M. L., Wang, Y. y Xu, Z. (2007). Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 86: 741-748.
- Huerta-Ocampo, J. A. y Barba de la Rosa, A. P. (2012). Caracterización bioquímica y estructural de las proteínas de reserva de amaranto”, en E. Espitia-Rangel (ed.), *Amaranto: Ciencia y Tecnología*, Mexico, INIFAP/SINAREFI, pp. 293-302 (Libro Científico núm. 2).
- Hurrell, R. F. y Finot, P. A. (1984). Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidized polyphenolic acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 177, 423-435.
- Idarriaga, A., Ortíz, R., Callejas, R. y Merello, M. (Eds.). (2011). Listado de las plantas vasculares del departamento de Antioquia (Cap. 3, pp. 127-551). En: *Flora de Antioquia: catálogo de las plantas vasculares*. Bogotá, Colombia: D´Vinni. 2v., 551 p. (Serie biodiversidad y recursos naturales).
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Sistema de información geográfica y demográfica de consulta. México, D.F.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from deffated skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods*, 5, 1854-1862.
- Islam, K., Kumar, A., Mahmud, H., Ferdous, M., Shefa, J. y Salman, M. (2010). Dietary fibre intake and influences on risk factors reduction in coronary heart disease patient. *Bangladesh Journal Medicine.* 21: 96-100.

- Ivanova, P., Chalova, V., Koleva, L. y Pishtiyski, I. (2013). Amino acid composition and solubility of proteins isolated from sunflower meal produced in Bulgaria. *International Food Research Journal* 20(6): 2995-3000.
- Jacobsen, S. E. (2003). The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International*. 19: 167-177.
- Jacobsen, S. E., Iteno, K. y Mujica, A. (2002). Amaranto como cultivo nuevo en el norte de Europa. *Agronomia Tropical*. Vol. 52(1): 109-119.
- Jahaniaval, F., Kakuda, Y. y Marcone, M. F. (2000). Fatty Acid and Triacylglycerol Composition of Seed Oils of Five *Amaranthus* Accessions and Their Comparison to Other Oils. *JAOCS*, Vol. 77, no. 8, 847-852
- Jamboonsri, W., Phillips, T., Geneve, R., Cahill, J. y Hildebrand, D. (2012). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L. a new w3 source. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 171-178.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. y Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 121: 178-184.
- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillensen, D. y Thomaidis, A. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Europ. J. Biochem.* 158: 379-382.
- Juan, R., Pastor, J., Alaíz, M., Megias, C. y Vioque, J. (2007). Seed protein characterization of eleven species of *Amaranthus*. *Grasas y Aceites*. 58:49-55.
- Juntachote, T. y Berghofer, E. (2005). Antioxidative, properties and stability of ethanolic extracts of Holy Basil and Galangal. *Food Chemistry*. Vol. 92, pp. 193-202.
- Karleskind, D., Laye, I., Morr, C. V. y Schenz, T. W. (1996). Emulsifying properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. *J. Food Sci.* 61, 54-58.
- Kim, S. Y., Park, P. S. W. y Rhee, K. C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 38: 651-656.
- Kitts, D. D. y Yuan, Y. V. (1992). Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* 3, 31-35.

- Kitts, D. D. y Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1309-1323.
- Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Nagasawa, T. y Moriyama, Y. (1992). Effect of casein, casein phosphopeptides, and calcium intake on ileal <sup>45</sup>Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 68: 765-781.
- Koeppe, S. J., Rupnow, J. H., Walker, C. E. y Davis, A. (1985). Isolation and heat stability of trypsin inhibitors in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). *Journal of Food Science.* 50: 1519-1521.
- Konishi, Y. y Yoshimoto, N. (1989). Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agricultural and Biological Chemistry.* 53: 3327-3328.
- Konishi, Y., Fumita, Y., Ikedo, K., Okuno, K. y Fuma, H. (1985). Isolation and characterization of globulin from sedes of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agricultural and Biological Chemistry.* 49: 1453-1459.
- Kopicová, Z. y Vavreinová, S. (2007). Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish. *Czech J. Food Sci.* 25: 195-201.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Design.* 9: 1297-1308.
- Kovacs-Nolan, J. Phillips, M. y Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8421-8431.
- Koziol, M. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of Quinoa. (*Chenopodium quinoa* Willd.) *J. Food Comp. Anal.* 5:35-68.
- Krause, J. P. y Schwenke, K. D. (1995). Changes in interfacial properties of legumin from faba beans (*Vicia faba* L.) by tryptic hydrolysis. *Nahrung.* 39, 396-405.
- Kumomura, K. (2000). Focus on FOSHU functional foods. *Food Manuf.* 75, 30-32.
- La Vecchia, C., Decarli, A., Serafini, M., Parpinel, M., Bellico, R. y Galeone, C. (2013). Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer: a large case-control study in Italy. *International Journal of Cancer.* 133: 1447-1452.

- Laguna, P. (2003). La Cadena Global de la Quínoa: un reto para la Asociación Nacional de Productores de Quínoa. Autor.
- Lamas, M. (2013). La chia, un cultivo muy rentable. El economista. México. [On-line]. Available from <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2013/03/19/chia-cultivo-muy-rentable>. Accessed: 13 September, 2017
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust vean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. Food Chemistry. 86:345-355.
- Layman, K. D. (1987). Energy and protein metabolism during exercise. Cereal Foods World. 32, 178-181.
- Lehmann, J. W. (1996). Case Historic of Grain *Amaranthus* and Alternative Crop. Cereal Foods World. 41:399-411.
- Leon-Camacho, M., Garcia-Gonzalez, D. I. y Aparicio, R. (2001). A detailed study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. Eur. Food Res. Technol. 213: 349-355.
- Lescano, J. L. (1994). Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos: quínoa, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. Programa Interinstitucional de Waru Waru, Convenio INADE/PELT-COTESU. 459 p.
- Leung, E. H. W. y Ng, T. B. (2007). A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. J. Pept. Sci. 13: 762-767.
- Li, G. H., Le, G. W., Liu, H. y Shi, Y. H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity. Food Science and Technology International. 11(4), 281-287.
- Li, R. P., Guo, M. L., Zhang, G., Xu, X. F. y Li, Q. (2006). Neuroprotection of nicotiflorin in permanent focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29: 1868-1872.
- Li-Chan, E. y Nakai, S. (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. Crit. Rev. Poult. Biol. 2: 21-58.
- Lin, C. S. y Zayas, J. F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. J. Food Sci. 52, 1308-1311.
- Lin, L., Umahara, M., York, D. A. y Bray, G. A. (1998). Betacasomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fat in rats. Peptides. 19: 325-331.



- Lobo, R. (2012). Apuntan al desarrollo agronómico de la chía como una alternativa de diversificación. Tucumán, Argentina. La Gaceta. [On-line]. Available from <http://www.lagaceta.com.ar/nota/479373/apuntan-al-desarrollo-agronomico-chia-como-alternativa-diversificacion.html>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- Lobo, R., Alcocer, G., Fuentes, J., Rodríguez, W., Morandini, M. y Devani, M. (2011). Desarrollo del cultivo de chia en Tucuman, República Argentina. *Avance Agroindustrial*. 32(4): 27-30.
- Lopez de Romana, G., Graham, G., Rojas, M. y MacLean, W. (1981). Digestibilidad y calidad proteínica de la quínoa: estudio comparativo en niños, entre semilla y la harina de quínoa. *Arch. Latinoam. Nutr.* 31(3): 485-497.
- López, M. G., Bello-Pérez, L. A. y Paredes-López, O. (1994). Amaranth Carbohydrates. Paredes-López, O. (ed.), *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL. 107-132.
- Lopez-Mejia, O. A., Lopez-Malo, A. y Palou E. (2014). Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 64(1), 50-58. ISSN 0004-0622
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J. y Millan, F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 76, 349-356.
- Lqari, H., Pedroche, J., Girón-Calle, J. Vioque, J. y Millán, F. (2005). Production of lupinus angustifolius protein hydrolysates with improved functional properties. *Grasas y Aceites*. 56(2): 135-140.
- Mahajan, A. y Dua, S. (1995). Functional properties of rapeseed protein isolates. *J. Food Sci. Technol.* 32, 162-165.
- Manley, C. H., McCann, J. S. y Swaine, R. L. Jr. (1981). In *The Quality of Foods and Beverages*. Eds. G. Charalambous and G. Inglett. Vol. 1. Academic Press, London.
- Mannheim, A. y Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *JAOCS*. 69, 1163-1169.
- Marcone, M. F. y Kakuda, Y. (1999). A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung* 43, Nr. 6, S. 368-373.

- Marineli, R. S., Aguiar Moraes, E., Alves Lenquiste, S., Teixeira Godoy, A., Nogueira Eberlin, M. y Maróstica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT – Food Science and Technology*. 59:1304-1310.
- Marshal, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med. Rev.* 9: 136-156.
- Martinez Augustin, O. y Martinez de Victoria Muñoz, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* 21: 1-14.
- Martinez, E. N. y Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of Amaranthus protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2523-2530.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 17(6): 271-278.
- Maruyama S. y Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1393-1394.
- Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(12), 2244-2245.
- Matsui, T., Li, C. H. y Osajima, Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Pept. Sci.* 5: 289-297.
- Matsui, T., Yuki Yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Nutr. Biochem.* 13: 80-86.
- Mazoyer, E, Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H. y Fiat, A. M. (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.* 194: 43-49.
- McMichael-Phillips, D. F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S. A., Howell, A., Potten, C. S. y Bundred, N. J. (1998). Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1431-1435.
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*. 21: 55-61

- Melo-Ruíz, V., Schettino-Bermúdez, B., Rodríguez-Diego, J., Díaz-García, R., Calvo-Carillo, C. y Garz-Urioste, C. (2016). Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.) Wild Plant Rich in Nutrients. *Journal of Life Sciences*. 10:221-227.
- Meredith, C. N., Zackin, M. J., Frontera, W. R. y Evans, W. J. (1989). Dietary protein requirements and body protein metabolism in endurance-trained men. *J. Appl. Physiol.* 66, 2850-2856.
- Meredith, J. W., Ditesheim, J. A. y Zaloga, G. (1990). Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. *J. Trauma*. 30, 825-828.
- Meyers, K. J., Rudolf, J. L. y Mitchell, A. E. (2008). Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 830-836.
- Miguel, M., López-Fandino, R., Ramos, M. y Alexandre, A. (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British J. Nutr.* 94: 731-737.
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 48: 91
- Miranda, F. (2012). Guía técnica para el manejo del cultivo de Chía (*Salvia hispanica* L.) en Nicaragua. [http://cecoopsemein.com/Manual\\_de\\_poducion\\_de\\_CHIA\\_SALVIA\\_HISPANICA.pdf](http://cecoopsemein.com/Manual_de_poducion_de_CHIA_SALVIA_HISPANICA.pdf)
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, M. J., Maureira, H. y Martínez, E. A. (2012). Nutrition aspects of six quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72(2): 175-181.
- Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishimura, K. y Hayashi, Y. (1999). Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63: 1684-1690.
- Moldes, A.B., Cruz, J. M., Dominguez, J. M. y Parajo, J. C. (2002). Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehidrolized barley husks. *Agr. Food Sci. Finland*. 11(1): 51-58.

- Monroy-Torres, R., Mancilla-Escobar, M., Gallaga-Solorzano, J., Medina-Godoy, S. y Santiago-García, E. (2008). Protein digestibility of chia seed *Salvia hispanica* L. *Revista salud pública y nutrición*. 8(1): 1-9.
- Moore, R.G., McDermott, D.L. y Wood, T.R. (1948). Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal Chem* **20**, 620-624. DOI: 10.1021/ac60019a007
- Morimatsu, F., Ito, M., Budijanto, S., Watanabe, I., Furukawa, Y. y Kimura, S. (1996). Plasma cholesterol-suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42: 145-153.
- Morimatsu, F. y Kimura, S. (1992). Hypocholesterolemic effect of partial hydrolyses of pork meat in rats. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 39: 770-777.
- Mossaheb, N., Schafer, M., Schlogelhofer, M., Klier, C., Cotton, S. y McGorry, P. (2013). Effect of omega-3 fatty acids for indicated preventions of young patients at risk for psychosis: When do they begin to be effective. *Schizophrenia research*. 148(1-3): 163-167.
- Mujica, A. (1992). Granos y leguminosas andinas. In: J. Hernandez, J. Bermejo y J. León (eds.). *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, Roma. Pp. 129-146.
- Muñoz, L. (2012). Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): microstructure, physicochemical characterization and applications in food industry. Tesis Doctoral en ciencias de la ingeniería. Santiago, Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, Escuela de Ingeniería. 146h.
- Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B. y Hidayat, M. A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 141: 4102-4106
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K. y Kanamaru, Y. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk betalactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 11-17.
- Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y. y Hori, G. (1999). Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J. Nutr.* 129: 1725-1730.

- Ng, S. C., Anderson, A., Coker, J. y Ondrus, M. (2007). Characterization of lipid oxidation products in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Chem.* 101:185-192.
- Nielsen, P. M. y Olsen, H. S. (2002). Enzymic modification of food protein. In: Whitehurst, R. J., Law, B. A. (Eds.). *Enzymes in food technology*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2002. Cap. 6, p. 109-143.
- Nitrayová, S., Brestenský, M., Heger, J., Patráš, P., Rafay, J. y Sirotkin, A. (2014). Amino acids and fatty acids profile of chia (*Salvia hispanica* L.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) seed. *Potravinárstvo® Scientific Journal for Food Industry*. Vol. 8, no. 1, p. 72-76.
- Ogrodowska, D., Zademowski, R., Czaplicki, S., Derewiaka, D. y Wronowska, B. (2014). Amaranth Seeds and Products – The Source of Bioactive Compounds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 64:165-170
- Ogungbele, H. (2003). Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 153-158.
- Ogungbele, H., Oshodi, A. y Oladimeji, M. (2009). The proximate and effect of salt applications on some functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *Pak. J. Nutr.* 8(1), 49-52.
- Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the rennin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 283-308.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2010). Segundo Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el Mundo. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Roma, 2010.
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B. y Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT-Food Science and Technology.* 64, 236-242.
- Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals.* 17: 189-196.
- Orsini, M. C., Tironi, V. A. y Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT – Food Science and Technology.* 44, 1752-1760.

- Ortíz de Montellano, B. (1993). Población y capacidad de carga de la cuenca de México. (Cap. 3, pp. 92-121). En: Medicina, salud y nutrición azteca. México: Siglo XXI. 346 p.
- Oshima, G., Shimabukuro, H. y Nagasawa, K. (1979). Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digest of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys. Acta* 566:128-137.
- Oshodi, A., Ogungbele, H. y Oladimeji, M. (1999). Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed, pearl millet and quinoa flours. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 325-331.
- Ovensen, L. (1991). Palatability and intake of two commercial lipid diets in patients with poor appetite. *Eur. J. Clin. Nutr.* 45, 273-275.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition.* 44, 307-315.
- Pal, J., Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. (2001). Physicochemical properties of hydroxypropyl derivative from corn and amaranth starch. *Carbohydr. Polym.* 48: 19-53.
- Palombini, S. V., Claus, T., Maruyama, S. A., Gohara, A. K., Pereira Souza, A., H., Souza, N. E., Visentainer, J. V., Marques Gomez, S. T. y Matsushita, M. (2013). Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science and Technology*, 33(2), 339-344. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000051>.
- Pasi, A., Mahler, H., Lansel, N., Bernasconi, C. y Messiha, F. S. (1993). B-Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80:305-322.
- Pearce, R. J. (1995). Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology.* Vol. 50, No. 1, p.15-23.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. (2002). Utilization of chickpea protein isolated for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 82(9), 960-965.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megias, C., Giron-Calle, J. y Alaiz, M. (2007). Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res. Int.* 40: 931-938.

- Peiretti, P. G. y Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Food Science and Technology*. 148:267-275.
- Pihlanto, A. y Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Adv. Food Nut. Res.* 47: 175-276.
- Piotrowicz, I. B. B. y Mellado, M. M. S. (2015). Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. *International Food Research Journal*. 22(3): 1203-1211.
- Poutanen, K. (1997). Enzymes an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends in Food Sci. Technol.* 8, 300-306.
- Pozo, S. (2010). Alternativas para el control químico de malezas anuales en el cultivo de la chia (*Salvia hispanica*) en la granja. ECAA, provincia de Imbabura. Tesis. Ingeniería Agropecuaria. Ibarra, Ecuador: Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales. E.C.A.A.: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 113h.
- PROECUADOR. (2014). Agroindustria. Ecuador. [On-line]. Available from <http://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/agroindustria/>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- PURECHIA. (2013). Growin regions: the right seed for the right región in the right soil. Colombia. [On-line]. Available from <http://purechia.co/corporate/growing-regions/>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- Qi, W. y He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Front. Chem. China*. 1(3): 308-314.
- Que, F., Mao, L. y Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*. 39, 581-587
- Ramamoorthy, T. (1985). Flora fanerogámica descriptiva: *Salvia* L. (Cap. 2, pp. 632-644). En: Calderón, G. y Rzedowski, J. 2010. Flora fanerogámica del valle de México. Michoacan: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1406 p.
- Raya-Pérez, J., Aguirre-Mancilla, C., Gil-Vega, K. y Simpson, J. (2010). La domesticación de plantas en México: comparación de la forma cultivada y silvestre de *Byrsonima crasifolia* (Malpighiaceae). *Revista Polibotánica*. 30: 239-256.

- Rennie, R. P., Strong, D., Taylor, D. E., Salama, S. M., Davidson, C. y Tabor, H. (1994). *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony: epidemiological observations and typing of the causative organism. *J. Clin. Microb.* 32, 721-724.
- Repo, R. A. M. y Serna, L. A. (2011). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.* 31(1): 225-23
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C. y Jacobsen, S. E. (2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev. Int.* 19:179-189.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A. y Valdivia-Lopez, M. A. (2008). Dietary fiber content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry.* 107: 656-663.
- Robertson, G. L., Monredon, F. D., Dyssele, P., Guillon, F., Amado, R. y Thibault, J. F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 33: 72-79.
- Rojas, W. (2003). Multivariate analysis of genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm. *Food Reviews International.* Vol. 19 (1-2): 9-23.
- Rojas, W., Mamani, E., Pinto, M., Alanoca, C. y Ortuño, T. (2008). Identificación taxonómica de parientes silvestres de quínoa del Banco de Germoplasma de Granos Altoandinos. *Revista de Agricultura – Año 60, Nro. 44. Cochabamba, Bolivia, Diciembre 2008.* Pp. 56-65.
- Rosua, J. y Blanca, G. (1986). Revisión del género *Salvia* L. (Lamiaceae) en el Mediterráneo Occidental: la sección *Salvia*. *Acta Botánica Malacitana.* 11: 227-272.
- Ruales, J. y Nair, B. M. (1994). Properties of starch and dietary fibre in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 45: 223-246.
- Rutherford-Markwick, K. J. y Moughan, P. J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Int.* 88: 955-966.
- Rzedowski, G. C. (1979). Amaranthaceae. En: Rzedowski, J. y G. C. de Rzedowski. *Flora Fanerogamica del Valle de México. Volumen 1.* Compañía Editorial Continental, S. A., México. 144-146.



- Saeed, M. y Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. *J. Food Sci.* 53, 1127-1131.
- Saiga, A., Kanda, K., Wei, Z., Okumura, T., Kaneko, T. y Nishimura, T. (2003). Hypotensive activity of muscle protein and gluten hydrolysates obtained by protease treatment. *J. Food Biochem.* 26: 391-401.
- Salcedo-Chavez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Dominguez-Dominguez, J. y Paredes-Lopez, O. (2002). Optimization of the Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 50:6515-6520.
- Salgado-Cruz, M. P., Cedillo-López, D. y Beltrán-Orozco, M.C. (2005). Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chia (*salvia hispanica*) y de la fibra dietaria obtenida de la misma. Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos. Tercer Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México, Respyn. 13, 358-366.
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Pedroche, J., Bautista, J. y Millán, F. (1999a). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 64, 237-243.
- Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. y Millan, F. (1999b). Interaction of chickpea (*Cicer arietinum* L.) legumin with oxidized linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* 47, 813-818.
- Sandoval-Oliveros, M. R. y Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193-201.
- Sargi, S. C., Silva, B. C., Santos, H. M. C., Montanher, P. F., Boeing, J. S., Santos Junior, O. O., Souza, N. E. y Visentainer, J. V. (2013). Antioxidant capacity and chemical composition in chia, flax, and perilla. *Food Sci. Technol.* 33(3):541-548.
- Sarker, D. K., Wilde, P. J. y Clark, D. C. (1995). Control of surfactant-induced destabilization of foams through polyphenol-mediated protein-protein interaction. *J. Agric. Food Chem.* 43, 295-300.

- Sato, R. Noguchi, T. y Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutri. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. 32, 67-76.
- Sauer, J. D. (1950). The grain amaranth: a survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 37: 561-616.
- Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 37: 561-616.
- Sava, G. (1996). Pharmacological aspects and therapeutic application of lysozymes. *EXS*. 75: 433-449.
- Schmitzová, J., Kludiny, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W. y Hanes, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol. Life Sci*. 54: 1020-1030.
- Schneider, C. (2009). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53(3): 315-321.
- Schnetzler, K. A. y Breene, W. M. (1994). Food uses and amaranth product research: a comprehensive review. In: Paredes-López, O. (ed.), *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL. 155-184.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), (2012). México, D.F. [On-line]. Available from <https://www.gob.mx/siap/>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- Sefa-Dedeh, S. y Stanley, D. (1979). Cowpea proteins 1. Use of response surface methodology in predicting cowpea (*Vigna unguiculata*) protein extractability. *J. Agric. Food Chem*. 27, 1238-1243.
- Segura, M. R., Peralta, F., Chel, L. y Betancur, D. (2013). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica* L.) Produced by Enzymatic Hydrolysis. *International Journal of Food Science*. Vol. 2013, 8 pages.
- Segura-Campos, M. R., Ciau-Solis, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. (2014). Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*. 5:220-226.

- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. P. y Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. En: *Amaranth Biology Chemistry and technology*. Paredes-López, O. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. 75-106.
- Senft, J. P. (1979). Protein quality of amaranth grain. In: *Proceeding of second amaranth conference* Rodale Press, Emmaus, PA. 43-47.
- Sentandreu, M. A. y Toldrá, F. (2006). A fluorescent-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocol*. Vol. 1, No. 5. 2423-2427.
- Sepehry, Z., Rahmani, F. y Heidari, R. (2012). Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science*. 6(6): 1068-1073.
- Shebuski, R. J., Berry, D. E., Romoff, R., Storer, B. L., Ali, F. y Samanen, J. (1989). Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thromb. Haemostasis*. 61: 183-188.
- Silk, D. B. A., Grimble, G. K. y Rees, R. G. (1985). Protein digestion and aminoacid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 44, 63-72.
- Silva, C., Garcia, V. A. S. y Zanette, C. M. (2016). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction usin different organic solvents: oil yield, fatty acids profile and technological analysis of deffated meal. *International Food Research Journal*. 23(3): 998-1004.
- Silva, S. V., Pihlanto, A. y Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J. Dairy Sci.* 89: 3336-3344.
- Simopoulos, A. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54: 438-463.
- Simopoulos, A. (2008). The importance of the omega-3/omega-5 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233: 674-688.
- Singh, H. (1961). Grain Amaranth, Buckwheat and Chenopods. Indian Council of Agricultural Research. *Cereal Crops*. Series No. 1. New Delhi. 104.
- Singh, N., Makharia, G. y Joshi, K. (2008). Dietary survey and total dietary fiber intake in patien with irritable bowel syndrome attending a tertiary referral hospital. *Indian Journal Gastroenterol*. 27: 66-70.

- Siow, H. L. y Gan, C. Y. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141(4), 3435-3442.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Monetti, M., Pazzucconi, F. y Gatti, E. J. (1995). Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *Nutr.* 125: 5985-6055.
- Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I. y Rustad, T. (2005). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*. 40: 1415-1424.
- Soriano-Santos, J. y Escalona-Buendia, H. (2015). Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *J. Food Sci. Technol.* 52(4): 2073-2082.
- Srivastava, R. y Roy, B. K. (2011). Effect of varying pH on protein composition and yield of amaranth seed (*Amaranth blitum*). *J. Environ. Biol.* 32:629-634.
- Suca Apaza, F. y Suca Apaza, C. A. (2010). Competitividad de la Quínoa. Una Aplicación del Modelo de Michael Porter. EUMED, Lima. [On-line]. Available from <https://www.eumed.net/libros/2010b/706/>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- Suetsuna, K. y Chen, J. R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae. *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol.* 3: 305-309.
- Suetsuna, K. y Osajima, K. (1989). Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 42: 47-54.
- Süle, E., Tömösközi, S. y Hajós, G. (1998). Functional properties of enzymatically modified plant proteins. *Nahrung*. 42, 242-244.
- Sun, H., Wiesenborn, D., Tostenson, K., Gillespie, J. y Rayas-Duarte, P. (1997). Fractionation of Squalene from *Amaranth* Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:413-418.
- Suryavanshi, V. L., Sathe, P. A., Baing, M. M., Singh, G. R. y Lakshmi, S. N. (2007). Determination of Rutin in *Amaranthus spinosus* L. Whole Plant Powder by HPTLC. *Chromatography*. 65: 767-769.
- Tamás, C., Kisgyörgy, B. N., Rakszergi, M., Wilkinson, M. D., Yang, M. S., Láng, L., Tamás, L. y Bedő, Z. (2009). Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality. *Plant Cell Reports*. 28: 1085-1094.

- Tandang-Silvas, M. R., Cabanos, C. S., Carrasco Peña, L. D., Barba de la Rosa, A. P., Osuna-Castro, J. A., Utsumi, S., Mikami, B. y Maruyama, N. (2012). Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglubulin, from *Amaranthus hypochondriacus*. Insight into its physico-chemical properties. *Food Chemistry*. 135: 819-826.
- Tapia, M. (1990). Cultivos Andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial INIAA – FAO, Oficina para América Latina y El Caribe, Santiago de Chile.
- Teichgräber, P., Zache, U. y Knorr, D. (1993). Enzymes from germinating seeds – potential applications in food processing. *Trends in Food Sci. Technol.* 4, 145-149.
- Teschemacher, H., Koch, G. y Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* 43: 99-117.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R. y Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*. 52:554-563.
- Tosi, E. A., Re, E. D., Lucero, H. y Masciarelli, R. (2001). Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. *Food Chem.* 73: 441-443.
- Tovar-Perez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-Gonzalez, A. y Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*. 116, 437-444.
- Turgeon, S. L., Gauthier, S. F. y Paquin, P. (1992). Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57, 601-604, 634.
- Ulloa, J. A., Rosas-Ulloa, P. y Ulloa-Rangel, B. E. (2011). Physicochemical and functional properties of a protein isolate produced from sunflower (*Carthamus tinctorius* L.) meal by ultrafiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91: 572-577.
- USDA. (2013). Natural resources conservation service. Estados Unidos. [On-line]. Available from <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SAHI6>. Accessed: 13 Septiembre, 2017.
- Valencia-Chamorro, S. A. (2003). Quinoa. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Vol. 8. Academic Press, Amsterdam. 4895-4902. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00995-0>.

- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C. y Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*. 48, 843-849.
- Valenzuela, R., Bascuñan, G., Chamorro, R. y Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 y cáncer, una alternativa nutricional para su prevención y tratamiento. *Revista Chilena de nutrición*. 38(2): 219-226.
- Vani, B. y Zayas, J. F. (1995). Wheat germ protein flour solubility and water retention. *J. Food Sci.* 60(4): 845-848.
- Vazquez-Ovando, A., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L. y Betancun-Ancona, D. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT-Food Science and Technology*. 42:168-173.
- Vazquez-Ovando, J. A., Rosado-Rubio, J. G., Chel-Guerrero, L. A. y Betancun-Ancona, D. A. (2010). Procesamiento en seco de harina de chíá (*Salvia hispanica* L.): caracterización química de fibra y proteína. *CyTa – Journal of Food*, 8:2, 117-127, DOI: 10.1080/19476330903223580
- Vazquez-Ovando, A., Betancur-Ancona, D. y Chel-Guerrero, L. (2013). Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *CyTA – Journal of Food*. Vol. 11, No. 1, Feb. 2013, 75-80.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L. y Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review. *J. Sci. Food Agric.* 90(15): 2541-2547. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4158>.
- Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Bautista, J. y Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites*. Vol. 50. Fasc. 6, 472-476.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. y Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *JAOCS*. 77, en prensa.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. y Millán, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *JAOCS*. 76, 819-823.

- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M. M. y Millán, F. (2001). Obtencion y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*. Vol. 52. Fasc. 2, 127-131.
- Waggle, D. H., Steinke, F. H. y Shen, J. L. (1989). Isolated soy protein. In "Legumes. Chemistry, technology and human nutrition". (R. H. Matthews, ed.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Walker, J., Sytsma, K., Treutlein, J. y Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematic, radiation, and ecological specializations of *salvia* and tribe *mentheae*. *American Journal of Botany*. 91(7): 1115-1125.
- Wang, W. y Gonzalez, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *CRFSFS*. 4: 63-78.
- Wang, W., Bringe, N. A., Berhow, M. A. y Gonzalez de Mejia, E. (2008). b-conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4012-4020.
- Wang, Y., Chung, O. y Song, O. (2012). Plasma and Dietary Antioxidant Status as Cardiovascular Disease Risk Factors: A Review of Human Studies. *Nutrients*. 5: 2969-3004.
- Weber, C., Gentry, H., Kohlhepp, E. y McCrohan, P. (1991). The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. *Ecol. Food Nutr.* 26: 119-125.
- Williams, J. T. y Brenner, D. (1995). Grain amaranth (*Amaranthus* species). In: Williams, J. T. (ed.), *Underutilized Crops: Cereals and Pseudocereals*. Chapman & Hall, Londo, UK. 129-187.
- Wood, S., Lawson, L., Fairbanks, D., Robinson, L. y Andersen, W. (1993). Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. United Nations University. 6(1). P. 41-44.
- Wright, K. H., Pike, O. A., Fairbanks, D. J. y Huber, S.C. (2002). Composition of *Atriplex hortensis*, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Chem. Toxicol.* 67:1383-1385.
- Wu, H. C., Chen, H. M. y Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 36: 949-957.

- Xu, L. y Diosady, L. L. (1994). Functional properties of chinese rapeseed protein isolates. *J. Food Sci.* 59, 1127-1130.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77: 917-922.
- Yamamoto, N., Ejiri, M. y Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1345-1355.
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R. y Bourquin, C. (2013). Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity.* 38(6): 1154-1163.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T. y Ishii, K. (1992). Studies on the functional properties of food grade soybean products: whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 719-727.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. (2003). Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.* 81: 363-369.
- Yust, M.M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Vioque, J., Millán, F. y Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chem* **85**, 317-320. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.026
- Zar, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis*. 3rd Edition, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River.
- Zavala, G. L. y Caputo, M. G. (1985). El Sur Andino Peruano y la coyuntura de sequía: 1982-1983. *Desastres naturales y sociedad en América Latina.* 4:13.
- Zhou, B., He, Z., Yu, H. y Mukherjee, K. (1990). Proteins from double-zero rapessed. *J. Agric. Food Chem.* 38, 690-694.
- Zhu, N., Sheng, S., Li, D., Lavoie, E., Karwe, M., Rosen, R. y Ho, C. (2001). Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Lipids.* 8, 37-44.



## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Aldo Rodrigo González Luna**

Candidato para el grado de  
Doctor en Ciencias con Acentuación en  
Manejo y Administración de Recursos Vegetales

**Tesis: OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE RECURSOS  
VEGETALES SUBUTILIZADOS CON POTENCIAL AGROALIMENTARIO**

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Vida

**Datos Personales:** Nacido en Morelia, Michoacán el 16 de Abril de 1987, hijo de Álvaro González Cardiel y Alma Lilia Luna Ramírez.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2011.

**Experiencia Profesional:** Estancia de investigación en el Instituto de la Grasa en la ciudad de Sevilla, España durante 2016. Profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2017. Responsable del Programa para el Desarrollo Profesional Docente desde 2018.